J. Fd Hyg. Safety 21(4), 269–273 (2006)

소르빈산 칼륨의 GJIC 억제로 인한 간독성 유발

황재웅[1,2] · 정지혜[1,2] · 정지원[1,3] · 정지윤[5] · 김선중[1,2] · 박정란[1,2] · 안지윤[4] · 하태열[4] · 김성란[4] · 이영순[1,2,3] · 강경선[1,2,3†]

[1]서울대학교 수의과대학 수의공중보건학교실, [2]BK21 수의과학연구인력양성사업단,
[3]학술진흥재단 지정 인수공통질병 중점연구소, [4]한국식품연구원, [5]공주 대학교 산업과학대학 특수 동물학과

Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication by Food Preservatives Potassium Sorbate

Jae-Woong Hwang[1,2], Ji-Hye Chung[1,2], Ji-Won Jung[1,3], Ji-Youn Jung[5], Sun-Jung Kim[1,2], Jung-Ran Park[1,2], Ji-Yun Ahn[4], Tae-Youl Ha[4], Sung-Ran Kim[4], Yong-Soon Lee[1,2,3], and Kyung-Sun Kang[1,2,3†]

[1]*Laboratory of Stem Cell and Tumor biology, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742*
[2]*BK21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul, 151-742*
[3]*KRF Priority Research Institute for Zoonotic Disease*
[4]*Food Function Research Division, Korea Food Research Institute*
[5]*Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Chung-nam, 340-702*
(Received November 18, 2006/ Accepted December 18, 2006)

ABSTRACT - Potassium Sorbate (PS) is a potassium salt version of sorbic acid, which has antimicrobial and fungistatic features in foods. Therefore, PS is used as a food preservative against fungi and mold. PS has been found to be non-toxic even when taken in large quantities given its trait to be broken down in the body into water and carbon dioxide. Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC) is essential in the maintenance of tissue homeostasis during development and differentiation. This study was made of the effects of PS on GJIC in WB-F344 rat liver epithelial (WB) cells. We found dramatic decrease of cell viability in time- and dose-dependent manners when WB cells were treated with PS. The effect of PS on GJIC is strong inhibition, and it took place in parallel with a hyperphosphorylation of connexin 43 expression. The finding that PS interferes with gap junction functionality should be considered with respect to the mechanism of PS-induced hepatotoxicity.

Key words: Potassium Sorbate, Gap Junctional Intercellular Communication, hepatotoxicity

소르빈산 칼륨(Potassium Sorbate)을 포함한 소르빈산(Sorbic acid)은 항균 활성을 갖고 있으며, 효모와 다른 진균들의 성장을 억제할 수 있다. 소르빈산 칼륨은 1940년대부터 효과적인 항균제로 사용되어 왔으며, 이러한 성질로 인하여 식품과 음료, 일부의 화장품 및 제약품, 담배 등에서 보존제로 광범위하게 사용되고 있다[1]. 소르빈산 칼륨은 1950년대부터 안전성과 효능에 대하여 동물실험 및 역학조사 등을 통하여 반복 시험되어 인체에 해가 적은 것으로 보고되고 있으며 오늘날의 식품 첨가제 중 가장 안전한 것 중의 하나로 인식되고 있다. 현재까지 소르빈산 칼륨이나 그 분해물질이 암유발을 일으킬 수 있다는 보고는 아직까지는 없다. 그러나 세포독성에 관하여 보고가 되고 있으며 그중 한 연구는 소르빈산 칼륨에 노출된 랫드에서 명백한 세포 손상을 보고한 적이 있다[2]. 이와같이 안전하다고 알려진 소르빈산 칼륨의 식품첨가제로서의 사용에 있어서 세포 독성의 가능성을 보이고 있으며 간독성의 가능성을 검색해볼 필요가 있을 것이다.

Gap Junction은 세포와 세포사이에 존재하는 Junction 중의 하나로 옆에 인접한 세포와 서로 물질을 주고받는 세포막에 존재하는 통로이다[3]. 이러한 Gap Junction 통로는 다

†Author to whom correspondence should be addressed.
Kyung-Sun Kang, Laboratory of Stem cell and Tumor Biology, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shilim 9-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea. Tel: +82-2-880-1246, Fax: +82-2-876-7610 E-mail: kangpub@snu.ac.kr

른 이온 channel과는 달리 인접한 두 세포 간에 능동 확산에 의하여 물질을 이동시키므로 비교적 비특이적이라 할 수 있다. 생체의 대부분의 조직 장기가 이 Gap Junction을 통하여 일반적으로 정보를 주고받고, 이러한 Gap Junction은 거의 모든 생물체, 즉, 척추동물이나 무척추동물에 존재하고 있다. 정상조직에 있어서 Gap Junction을 통한 세포 간 정보전달(gap junctional intercellular communication; GJIC)은 세포의 항상성유지, 세포의 분화, 분비조직에 있어서 분비조절, 세포의 분화와 성장에 매우 중요한 역할을 한다[4]. GJIC의 장애는 종양의 촉진, 신경장애, 기형형성 등 사람이나 동물의 질병과 밀접한 관련을 가지고 있다고 보고되고 있다.

Gap junction을 구성하는 hexamer 구조의 단백질을 connexon이라고 하고, 이 connexon은 6개의 connexin이라 불리는 단백질로 구성되어 있어 인접한 세포가 각각 6개의 connexin을 내어 gap junction channel을 구성한다. GJIC는 connexin의 인산화에 큰 영향을 받으며[5] 통로의 개폐는 주로 connexin의 인산화를 통해서 이루어진다.

본 연구는 소르빈산 칼륨의 in vitro 상에서 세포 독성을 확인하는 것이며, 세포의 항상성 유지에 큰 기여를 하는 GJIC와의 상관성을 확인하고자 함이다.

재료 및 방법

세포배양

정상 WB-F344 랫드에서 분리된 간 상피 세포인 WB 세포주를 본 실험에 사용하였다. 세포는 5%의 FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL)이 함유된 EMEM(Gibco, BRL) 배양액에서 5%의 CO_2의 대기조건에서 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 세포는 75 mm 조직 배양 plate에서 배양되었고 이틀에 한번 배양액을 교체하였다. 실험에 사용된 WB 세포는 동결 보관에서 해동 후 8번까지 계대를 하였다.

세포독성의 측정

24 well plate에 1×10^5/ml개의 WB 세포를 파종한 후 세포가 70%의 confluency에 도달했을 때 농도별로 희석된 소르빈산 칼륨(Sigma, U.S.A.)을 각 well에 처치하여 24시간을 더 배양하였다. 물질처치가 끝나기 4시간 전 MTT solution (5 mg/ml)을 각 well에 추가하여 배양하였다. 1시간 세포 독성 측정의 경우 위와 같은 수의 세포를 파종한 후 100% confluency에 도달하였을 때 소르빈산 칼륨을 농도별로 1시간을 처치하고 MTT solution이 함유된 배지로 교체하여 4시간을 더 배양하였다. MTT solution을 추가하고 4시간 후 MTT solution이 함유된 배지를 버리고 각 well에 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)를 500 μl씩 넣어 활성이 있는 세포에서만 만들어진 formazan crystal을 용해한다. formazan crystal이 용해된 DMSO를 96 well plate에 옮긴 후 ELIZA plate reader (EL800, Bio-TEK Instruments, U.S.A.)에서 540 nm 파장으로 측정한다.

GJIC의 측정

소르빈산 칼륨이 Gap Junction을 통한 세포 간 정보전달(Gap Junctional Intercellular Communication; GJIC)에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 랫드의 간 상피세포인 WB 세포를 35 mm^2 dish에 파종한 후 37°C incubator에서 배양한 다음, 소르빈산 칼륨을 농도별 또는 시간대 별로 처치하여 배양하고, PBS로 3회 세척한 후 0.05% Lucifer yellow CH (Sigma, USA)를 첨가한 다음, 24호 blade를 이용하여 scrape line을 만든 다음 3분간 실온, 차광상태에서 incubation한 후 다시 PBS로 3회 세척한다. 세척 후 10% neutral formalin을 이용하여 고정시킨 후 inverted fluorescent microscope로 관찰하였다6).

Western Blotting

배양한 세포를 농도별로 소르빈산 칼륨을 처리하고, 일정 기간이 지난 후 PBS로 2~3회 washing 한 다음, lysis buffer (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 uM leupetin, 1 uM antipain, 0.1 uM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride in 20% SDS)를 처리하여 실온에서 10~20분 가량 incubation 하였다. 단백질을 12.5% SDS polyacrylamide gels에 200V에서 1시간동안 분리하고 100V, 350 mA에서 nitrocelluose membrane (Biorad, U.S.A.)에 1시간동안 transfer 시킨다. 이 membrane을 blocking agent인 5% dried skim milk가 포함된 T-PBS를 이용하여 1시간동안 blocking 한 후, 5% skim milk가 포함된 T-PBS에 primary antibody를 첨가하여 overnight incubation 한다. primary antibody를 반응시킨 후, T-PBS로 4회 nitrocellulose membrane을 washing 하고, secondary antibody를 1시간동안 반응시켜 incubation한 다음, T-PBS를 이용하여 4회 세척해준다. Antibody probe가 된 nitrocellulose membrane을 ECL chemiluminiscence detection reagent (Amersham, Sweden)를 이용하여 detection하고, X-ray film에 15초에서 1분간 상태에 따라 노출시킨다.

결과 및 고찰

WB 세포에서 소르빈산 칼륨에 의한 세포 독성 측정

WB 세포에서 소르빈산 칼륨의 노출에 의한 세포독성을

MTT 시험법으로 측정하였다. 소르빈산 칼륨을 100 mM 이하의 농도로 1시간 또는 24시간 동안 WB 세포에 노출하였을 경우 얻어진 세포독성은 Fig. 1과 같다. 소르빈산 칼륨을 24시간 동안 WB 세포에 노출하였을 경우, 20 mM에서부터 세포 활성이 80% 이하로 줄어들기 시작하였고 60 mM 이상의 농도에서는 세포의 활성의 저하가 현저하게 나타났다. 소르빈산 칼륨을 1시간 동안 노출하였을 경우, 24시간 노출에서와는 달리 80 mM까지는 세포 활성의 변화가 없었으며 100 mM 농도에서 세포 활성의 감소가 나타났다. 일반적으로 세포 활성의 측정에 대하여 80% 이하의 활성을 보일 때 세포 독성이 있음을 지시하게 되는데[7] 소르빈산 칼륨의 경우, 24시간 노출 시는 20 mM, 1시간 노출 시는 100 mM에서부터 세포 독성이 시작됨을 알 수 있었다. 소르빈산 칼륨에 의한 WB 세포에서 GJIC의 변화는 세포독성이 나타나지 않는 100 mM 미만의 농도에서 실험을 진행하였다.

WB 세포에서 소르빈산 칼륨에 의한 GJIC의 억제

Fig. 1에 의해 얻어진 세포 독성 농도를 바탕으로 소르빈산 칼륨을 1시간 동안 WB 세포에 노출하였을 경우, GJIC의 변화 양상을 알아보았다. GJIC의 활성 정도는 앞서의 재료와 방법에서 언급한 시험법을 사용하여, 물리적으로 세포에 자극을 가해 찢어진 세포 사이로 들어간 Lucifer Yellow CH (LY)가 gap junction을 통해 이웃 세포로 전이된 염색 정도로 평가를 하였다. Fig. 2-A의 대조군의 경우 LY가 중심의 scrape line을 기준으로 3층 이상의 퍼짐을 보여주는데 비하여, 소르빈산 칼륨을 처치하였을 경우는 농도 의존적인 LY의 염색의 감소 양상를 보여준다. 1시간 노출 시 세포독성이 나타나지 않았던 최고 농도인 80 mM에서는 GJIC의 활성이 거의 나타나지 않았다.

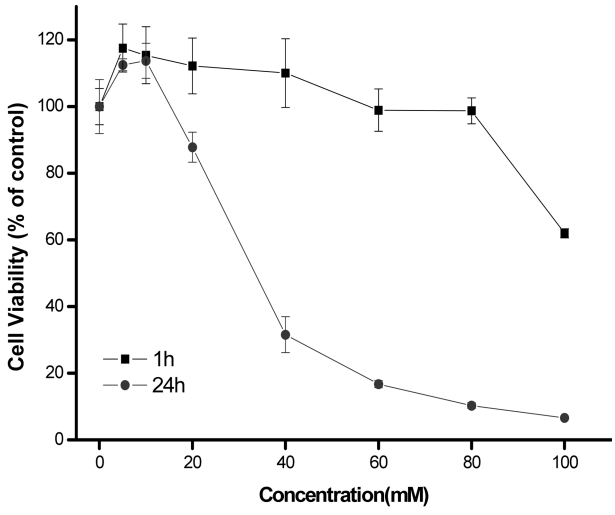

Fig. 1 Cytotoxic effect of PS on WB cells. Cells were treated with different concentration of PS for 1h or 24h. Cell survival rate was determined by MTT assay.

소르빈산 칼륨에 의한 GJIC의 억제를 검증하기 위하여 gap junction을 이루고 있는 단백질인 connexin 중 WB 세포에서 주로 발현하는 connexin 43 (Cx43)의 인산화 양상을 확인해 보았다. GJIC의 억제는 connexin의 활성 변화로 인해 gap junction이 막히게 되므로, 이는 간접적으로 connexin의 활성 측정을 통해 확인할 수 있다. Fig. 2-B에서 보듯이, 소르빈산 칼륨을 각 지시된 농도로 WB 세포에 노출하였을 때 대조군에 비하여 Cx43의 인산화가 일어난 P1과 P2 밴드의 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 이는 앞서의 Fig. 2-A의 소르빈산 칼륨에 의한 GJIC의 억제가 Cx43의 인산화를 통해서 일어났음을 반증한다.

GJIC의 변화 확인으로 인한 간독성 지시

소르빈산 칼륨을 지시된 시간대별로 처치하여 시간의 변화에 의한 GJIC의 변화 양상을 확인해보았다. Fig. 3에서 1시간, 6시간, 12시간 동안 소르빈산 칼륨을 24시간 노출 시 세포 독성을 나타내지 않은 농도인 20 mM의 농도로 WB

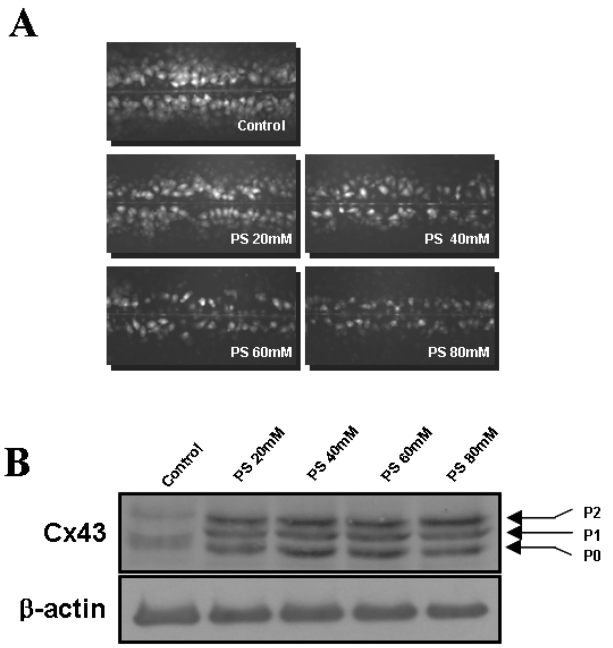

Fig. 2 Inhibitory effect of PS on GJIC in WB cells, as determined by SL/DT assay and Western blotting. (A) Cells were treated without PS (control) or with different concentration of PS for 1h. Then cells were scrape loaded. (B) Effect of PS on the phosphorylation pattern of Cx43 was measured. Total cellular protein extracts were prepared and western blot analysis was performed with 20 μg protein using antibody specific for Cx43. β-actin was control for protein loading.

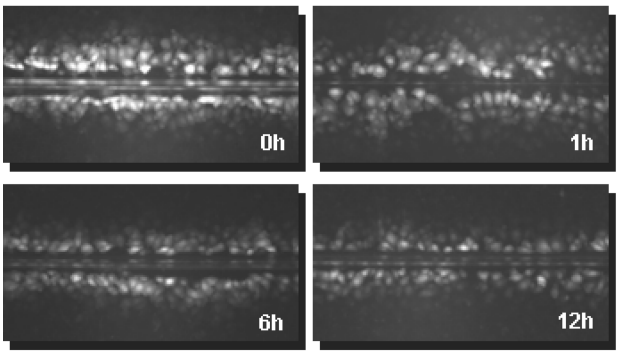

Fig. 3 PS-induced inhibition of GJIC in time-dependent manner, as determined by SL/DT assay. Cells were treated with 20mM of PS for different time points. Then cells were scrape loaded.

세포에 노출하였을 경우 1시간까지는 대조군에 비하여 GJIC의 감소가 나타나지 않았다. 6시간 노출부터는 대조군에 비하여 scrape line을 기준으로 lucifer yellow의 퍼짐이 현격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 세포 활성을 이용한 세포 독성의 측정에서 20 mM의 소르빈산 칼륨은 WB 세포에서 독성을 보여주지 못했지만 GJIC의 감소는 6시간부터 유의적으로 나타났다.

지금까지의 결과를 통해 현재까지 안전하다고 알려진 소르빈산 칼륨은 WB 세포에서 GJIC의 현격한 감소를 농도 및 시간 의존적으로 보여주었다. 감소된 GJIC로 인해 in vitro 상에서 항상성의 유지가 방해를 받게 되고 이로 인해 세포 활성의 감소로 인한 세포 독성이 유발된 것으로 사료된다. 소르빈산 칼륨은 in vitro 환경에서 간독성을 유발할 수 있으며, 간독성의 유발 기전 중의 하나가 GJIC의 억제임을 확인할 수 있었다. GJIC는 다양한 요소에 따라 회복 및 억제되는 것으로 알려져 있다. 소르빈산 칼륨으로 인해 유발된 GJIC의 억제 기전을 살펴봄으로써 그에 대응하는 방어기전을 연구함으로써 소르빈산 칼륨에 의한 간독성을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 한국식품연구원과 공동으로 연구되었으며 한국식품연구원 기본연구사업(GA063002), 2006년도 한국학술진흥재단(KRF-2006-005-J02903) 및 서울대학교 수의과학연구소의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드린다.

국문요약

소르빈산 칼륨은 소르빈산의 일종으로 항세균 및 곰팡이 발육 저지 효과를 갖고 있다. 이러한 성질로 인하여 소르빈산 칼륨은 곰팡이와 진균에 대한 식품 방부제로서 사용되고 있다. 소르빈산 칼륨은 많은 양에 노출되었을 때도 체내에서 수분과 이산화탄소로 분해되는 특성으로 인하여 독성이 없는 것으로 알려져 있다. gap junction을 통한 세포 간 신호 전달(GJIC)는 생체의 성장과 분화에 있어서 조직의 항상성 유지에 본질적인 역할을 하고 있다. 본 연구는 WB-F344 랫드의 정상 간 상피 세포(WB 세포)에서 소르빈산 칼륨을 노출하였을 때 GJIC에 대하여 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 그 결과 소르빈산 칼륨에 노출에 의하여 WB 세포의 GJIC가 농도 및 시간 의존적으로 현격하게 감소하는 것을 관찰하였다. 소르빈산 칼륨은 GJIC를 강력하게 억제하며, 이는 WB 세포에서 gap junction을 구성하는 connexin 43의 인산화와 병행하는 것을 확인하였다. 소르빈산 칼륨이 gap junction의 기능을 방해함으로 인해 소르빈산 칼륨에 의한 간독성이 유발될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Thakur, B.R., Singh, K. and Arya, S.S.: Chemistry of Sorbates - A Basic Perspective. *Food Rev. Int.*, **10**, 71-91 (1994).
2. Perez-Prior, M.T., Manso, J.A., Garcia-Santos, Mdel P., Calle E. and Casado J.:Alkylating potential of potassiun sorbate. *J. Agric. Food. Chem.*, **53**, 10244-10247 (2005).
3. Kumar, N.M. and Gilula, N.B.: The gap junction communication channel. *Cell*, **84**, 381-388 (1996).
4. Simon, A.M. and Goodenough, D.A.: Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cel.l Biol.*, **8**, 477-483 (1998).
5. Musil, L. S.; Cunningham, B.A., Edelman, G.M. and Goodenough, D.A.: Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.*, **111**, 2077-2088 (1990).
6. el-Fouly, M.H., Trosko, J.E., Chang, C.C.: Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap

junctional intercellular communication. *Exp. Cell Res.*, **168**, 422-430 (1987).

7. Hwang, J.W., Park, J.S., Jo, E.H., Kim, S.J., Yoon, B.S., Kim, S.H., Lee, Y.S. and Kang, K.S..: Chinese cabbage extracts and sulforaphane can protect H_2O_2-induced inhibition of gap junctional intercellular communication through the inactivation of ERK1/2 and p38 MAP kinases. *J. Agric. Food. Chem.*, **53**, 8205-8210 (2005).