

연잎추출물의 B형 간염 표면 항원 발현 억제 효과

이윤희 · 강이중 · 이성진[†]

전남대학교 응용생물공학부 생명공학전공

Nelumbo nucifera Leaves Extract Reduced the Production of Hepatitis B Surface Antigen on HepG2.2.15

Yun Hee Lee, Li Jung Kang, and Seong Gene Lee[†]

Department of Biotechnology (BK21 program), Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

ABSTRACT : *Nelumbo nucifera* (lotus) is known to be a useful medicinal plant and leaf extract contains several flavonoids and alkaloids. To analyze the effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract (NNL) on the HBsAg production, we treated NNL on HepG2.2.15 cells which contain the hepatitis B viral genome and secrete surface antigen into media. NNL suppressed the production of hepatitis B surface antigen as a dose-dependent manner. To analyze the effect of NNL on HBV DNA replication, PCR analysis was performed. NNL was not affected the HBV DNA replication and HBsAg mRNA expression. To understand the effect of NNL on the production of HBsAg, we carried out the analysis of lipid-metabolizing gene expression using one-step RT-PCR. NNL reduced the gene expression of FASN and SREBP2 and increased the expression of LDLR. Triglyceride content of HepG2.2.15 cells was not decreased by treatment of NNL. This result suggests a possibility that NNL may have an effect for the inhibition of hepatitis B surface antigen by modulation of lipid and cholesterol metabolism.

Key Words : Hepatitis B Virus, HepG2.2.15, HBsAg, Lipid Metabolism, *Nelumbo nucifera*

서 언

한국인 호발성 암 질환 가운데 간암은 높은 비율을 차지하고 있으며, 간암의 원인 가운데는 간염 바이러스에 의한 감염이 원인이 되어 발생하는 경우가 상당 부분을 차지하고 있으며, 가장 많은 감염률을 보이는 것은 B형 간염 바이러스에 의한 간염이다. 전 세계적으로 2억 만 명이상이 B형 간염 바이러스에 노출되어 있으며, 매년 5천만 명이 새롭게 B형 간염 바이러스에 감염되는 것으로 보고되고 있다. 이 가운데 성인의 경우 5-10%, 신생아의 90% 이상이 만성적으로 감염되는 것으로 보고되고 있으며, 특히 아시아의 경우 B형 간염 환자의 75%가 만성 간염으로 진행되거나 간암으로 발전하는 것으로 알려져 있다 (Merican *et al.*, 2000). 한국의 경우, 간 질환은 소화기계 질환의 대부분을 차지하는 주요한 질환으로 통계청 발표에 의하면 우리나라 2006년 간암 사망률은 10만 명당 남자의 경우 33.9명, 여자는 10.9명으로 나타났다. 또한 통계청 보고에 의하면 간 질환에 의한 사망률은 남자 10만 명당 12.3% (16,678명), 여자 사망자의 4.0% (4,426명)가 간 질환

과 간암으로 사망하였다. 우리나라 간암 발생 원인의 70% 이상이 B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus, HBV) 감염에 의한 것으로, 급성 바이러스성 간염의 60% 이상, 만성 활동성 간염과 간경변증의 약 73% 역시 HBV 감염에 의한 것으로 파악되고 있어, B형 간염의 예방 및 대책은 국민 건강 및 의료비 경감을 위해서도 매우 중요한 문제 중 하나이다 (Kim *et al.*, 1994; Jeong *et al.*, 2008). B형 간염 바이러스에 대한 많은 연구에도 불구하고 HBV의 숙주가 사람, 침팬지, 오리, 마멋 등의 간에서만 증식할 수 있는 특성으로 인해 연구에 제약이 있어 왔다. 1991년 미국 조지아타운 대학의 Korba 박사는 HBV 유전자를 사람 간암세포에 도입하여 HBV가 증식, 생산되는 특성을 가진 HepG2.2.15 세포주를 제조하였으며, 이를 이용하여 항 HBV 약효검색 시스템을 개발하였다 (Korba and Mulman, 1991; Korba and Gerin, 1992). HepG2.2.15 세포를 이용하여 항간염 효능을 분석한 연구로는 가자, 지유, 복분자, 대황 등을 이용하여 B형 간염 바이러스 증식에 미치는 영향을 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 1999).

연 (蓮, *Nelumbo nucifera*)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 수

[†]Corresponding author: (Phone) +82-62-530-2167 (E-mail) sglee3@chonnam.ac.kr
Received March 23, 2009 / Revised April 14, 2009 / Accepted April 18, 2009

련과의 여러해살이 수초로서 인도와 중국을 중심으로 열대, 온대의 동부 아시아를 비롯한 한국, 일본 등에 널리 분포하는 고생대의 식물로, 꽃은 관상용과 차제(茶劑)로 이용되어 왔으며, 잎과 뿌리는 식용하여 왔다. 한의학에서 잎은 하엽(荷葉)이라 하여 설사, 두통과 어지럼증, 토혈, 산후 어혈치료, 야뇨증, 해독작용에 쓰이고, 주요 성분으로는 진통작용과 진정작용이 있는 roemerine, nuciferin, arnepavine, n-nornucifrine, pronuciferine, d-n-methylcoclaurine, liriodenine, 주석산, 구연산, 사과산, 호박산, 탄닌 등이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다 (Yuk, 1990). 연 줄기는 연근(蓮根)이라고 하며, 비타민과 미네랄의 함량이 비교적 높아 생체나 그 밖의 요리에 많이 이용되며, 뿌리줄기와 열매는 약용으로 부인병에 쓰이기도 한다. 연을 이용한 생리활성 분석 연구는 연잎, 연근경, 연수술, 연씨, 연줄기 등 다양한 연조직으로부터 보고되고 있다. 연잎 추출물은 동물 모델에서 항비만 효능 (Ono *et al.*, 2006), 항산화 활성 (Wu *et al.*, 2003), 쥐의 백색지방세포의 지질 분해 촉진 (Ohkoshi *et al.*, 2007), 당뇨합병증 및 산화적 스트레스로부터 보호활성 (Jung *et al.*, 2008) 등이 보고되고 있다. 연의 근경 에탄올 추출물을 당뇨모델 쥐에 투여하였을 때 혈당을 조절하는 활성이 보고된 바 있다 (Mukherjee *et al.*, 1997). 연 씨 추출물은 herpes simplex virus type 1 (HSV-1)의 ICP나 ICP4의 mRNA 발현을 저해함으로써 바이러스 증식을 억제하는 항바이러스 효능이 있음이 보고되고 있다 (Kuo *et al.*, 2005). 또한 연잎으로부터 coclaurine이나 norcoclaurine, quercetin 3-O-β-D-glucuronide 등과 같은 유용 생리활성 물질이 분리 동정되었으며, coclaurine과 norcoclaurine은 강력한 항 HIV 활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다 (Kashiwada *et al.*, 2005).

이에 본 연구에서는 연잎 (*Nelumbo nucifera* leaves, 이하 NNL)으로부터 열수 추출물을 제조하여 hepatitis B 바이러스 유전자를 가지고 있는 HepG2.2.15 세포주를 이용하여 항간염 효능을 검토하고자, 연잎 추출물이 HBV의 표면 항원 (hepatitis B surface antigen; 이하 HBsAg) 발현에 미치는 영향을 분석하고, HBsAg가 세포 밖으로 분비될 때 숙주 세포의 콜레스테롤과 같은 지질성분을 필요로 한다는 보고로부터 (Lin *et al.*, 2003) 지질대사 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출방법

본 연구에 사용된 연잎은 2007년 6월 경 전남 해남군 일대 자연 언뜻에서 채취하였다. 음건한 연잎 100 g을 파쇄기로 분쇄한 후 10배의 물을 첨가하여 2시간 열수로 2회 반복 추출한 후 거르로 여과하고 450 × g로 원심분리 (Hanil Scientific Co., Seoul, Korea)하여 상층액을 회전 진공 농축기 (EYELA,

Japan)를 이용하여 감압농축 한 후 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

간암세포 HepG2에 hepatitis B virus (HBV) DNA를 transfection 하여 제조한 stable cell line HepG2.2.15 (경희대학교, 한의과대학, 김영철 교수 제공)를 본 실험에 이용하였다. HepG2.2.15 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 배지에 G418을 200 μg/ml을 첨가하여, 37°C, 5% CO₂가 공급되는 항온 세포 배양기에서 배양하였다.

3. 세포 독성 분석

연잎 추출물 (*Nelumbo nucifera* leaves, 이하 NNL)의 세포 독성을 확인하고자 XTT assay (Wel-GENE, Korea)를 실시하였다. 96-well plate에서 9 × 10³ cells/well의 농도로 배양된 HepG2.2.15 세포에, NNL을 7, 14, 28, 55, 110 ng/ml 농도를 처리하고 24시간 동안 배양한 후, XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt]와 PMS를 50 : 1로 섞은 후 20 ul를 well 당 첨가하여 3시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 450 nm과 690 nm에서의 흡광도를 측정 후 OD₄₅₀-OD₆₉₀의 값을 얻은 후 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율을 계산하였다.

4. B형 간염 바이러스 표면 항원 ELISA 분석

24-well plate에서 2 × 10⁵ cells/well의 농도로 HepG2.2.15 세포에, NNL을 7 ng/ml부터 110 ng/ml까지 다양한 농도를 처리하고 24시간, 48시간 동안 배양한 후, 배양액을 얻어 HBsAg ELISA kit(KOMA biotech, Korea)를 이용하여 B형 간염 바이러스 표면항원(HBsAg)을 검출하였다. 시료를 96 well plate에 각각 100 ul 씩 넣고 접합체액 25 ul 씩 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨다. 5회 세척한 후, 기질액을 100 μl 씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 반응정지액을 100 μl 씩 첨가하여 반응을 정지시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. HBV DNA 증식 분석

HBV DNA 증식의 변화를 분석하기 위하여 B형 간염 표면 항원 ELISA 분석에서 수득한 HepG2.2.15 세포 배양액을 이용하여 PCR 방법을 이용하여 HBV DNA 증식을 분석하였다. 5'-ATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT(L)-3'와 5'-ACAGTGGGGAAAGCCCTACGAA-3'를 PCR primer로 사용하였으며, 313 bp의 PCR band를 확인하였다. PCR 반응조건은 배양액 5 μl를 template로 사용하였으며, primer를 각각 5 pmol 씩, 200 μM dNTP, 1 U Taq polymerase를 첨가하여 최종 부피 20 μl로 PCR 반응을 수행하였다. 94°C에서 3 min간 1 cycle

Table 1. Gene list for RT-PCR.

Gene	Right primer (5' → 3')	Left primer (5' → 3')	Product size	Tm
FASN	AGTACACACCCAAGGCCAAG	GTGGATGATGCTGATGATGG	200	60
LDLR	CCCCGCAGATCAACCCCACTC	AGACCCCCAGGCAAAGGAAGACGA	369	60
SREBP2	CGCCACCTGCCCTCTCCTTCC	TGCCCTGCCACCTATCCTCTCACG	390	65
PPARG	GCAGGAGCAGAGCAAAGAGGTG	AAATATTGCCAAGTCGCTGTCATC	352	60
HBsAg	ATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT	ACAGTGGGGGAAAGCCCTACGAA	313	60
β-actin	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	243	60

반응한 후 94°C에서 30초, 48°C에서 30초, 72°C에서 30초 씩 44 cycles을 반복하고 최종 72°C에서 5분간 반응한 후 종료하였다. PCR 산물은 2% Agarose gel 전기 영동하여 확인하였다.

6. One-step RT-PCR 분석

NNL에 의한 유전자 발현 변화를 분석하기 위하여 Tri-Reagent (Molecular research Center, Cincinnati, OH)를 이용하여 total RNA를 제조사의 방법에 따라 추출하였다. Reverse transcription (RT) PCR 반응은 one-step RT-PCR PreMix kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 유전자 발현을 분석하였다. RT-PCR 반응에는 total RNA는 20 ng을 template로 사용하였으며, primer는 각각 5 pmole 씩 첨가한 후 diethylene pyrocarbonate (DEPC)-DW를 13 µl로 첨가하여 최종 부피를 20 µl로 하여 반응하였다. 반응 조건은 45°C에서 30분간 반응하고, 94°C에서 5분간 열처리하였다. 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 씩 34회 반복 한 후 72°C에서 5분간 반응한 후 종료하였다. PCR 반응 산물은 2% Agarose gel 전기 영동하여 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 Table 1에 정리하였다. HBsAg의 RNA를 분석하기 위하여 5'-ATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT-3'과 5'-ACAGTGGGGGAAAGCCCTACGAA-3'을 사용하였으며, product 크기는 313 bp이다.

7. Triglyceride 함량 분석

6-well plate에서 5 × 10⁵ cells/well의 농도로 배양된 HepG2.2.15 세포에, NNL을 7 ng/ml부터 110 ng/ml까지 다양한 농도를 처리하고 24시간 동안 배양한 후, cell을 scrap하여 homogenate buffer (2 M NaCl, 2 mM EDTA, 50 uM NaPi, pH 7.4)에 녹인 후 sonication으로 cell을 분쇄하였다. 냉각원 심분리기를 이용하여 4°C에서 13,200 rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 cell lysate에 butanol, Triton X-100 : MeOH (1 : 1, v/v) 용액을 2 : 2 : 1의 비율로 섞어준 다음 10-30분간 반응시켰다. 반응이 종료된 cell lysate를 10분간 13,200 rpm으로 원심 분리하여 상층액 10 µl를 취한 후 triglyceride reagent 와 free glycerol reagent (Sigma-Aldrich, USA)를 1 : 4 비율로 혼합물을 제조한 후, 200 µl를 첨가하여 다시 10분 동안 30°C에서 반응시켰다. 반응이 종료되면 SpectraMax 340

reader (Molecular Devices, Silicon Valley, USA)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Triglyceride (TG) 함량 (µg/mg of protein)은 단백질 함량으로 전환하여 계산하기 위해 각 cell lysate의 단백질 함량을 Bradford 분석법 (Sigma-Aldrich, USA)으로 정량하였다.

8. 통계처리

모든 측정 결과는 3반복 이상의 독립적인 실험에서 도출된 대표 값의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation; SD)로 나타내었다. 각 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, P < 0.05 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 독성

연잎 추출물 (NNL)이 hepatitis B virus (HBV)를 가지고 있는 HepG2.2.15 간세포 생장에 미치는 영향을 분석하기 위하여 XTT 분석법을 실시하였다. 분석 결과 Fig. 1에서 보여 주는 바와 같이 110 ng/ml의 농도까지는 비교적 세포 독성을 적게 나타내는 것으로 보였으며, 110 ng/ml의 이상의 농도에서는 세포 독성을 나타나기 시작하였다. 이하의 실험에서는 모두 110 ng/ml 이하의 농도를 사용하여 실험을 수행하였다.

2. B형 간염 표면 항원 발현 및 HBV 증식에 미치는 영향 분석

세포 독성을 나타내지 않는 농도인 110 ng/ml 이하의 농도에서 배지로 분비되는 HBV의 표면항원인 HBsAg의 함량을 ELISA 방법을 이용하여 분석하였다. 24시간과 48시간 동안 NNL을 처리하여 HBsAg의 양을 분석한 결과 무처리군에서 24시간 배양과 비교하였을 때 48시간 배양하면 HBsAg의 생성량이 약 40% 정도 증가하였다. NNL을 처리한 HepG2.2.15 세포는 HBsAg의 생성량이 NNL 농도 의존적으로 감소됨을 보였으며, 이 효과는 48시간 배양에서도 같은 결과를 나타내었다 (Fig. 2). 무처리군과 비교하여 보면 NNL 55 ng/ml 이상의 농도에서 HBsAg 발현 양을 약 50% 이상 감소시켰다. HBV의 표면 항원 생성을 억제하는 효능을 관찰함에 따라

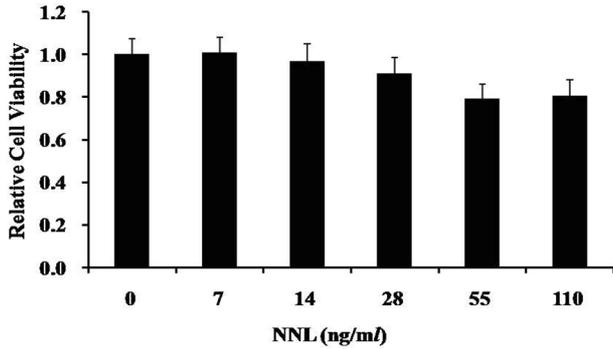


Fig. 1. Cell cytotoxicity of NNL on HepG2.2.15. HepG2.2.15 cells were plated on 96-well with 9×10^3 cells per well and treated with various concentrations of NNL for 24 hours and assayed the cell cytotoxicity with XTT assay kit (WelGENE, Korea) as followed in Materials and methods. All experiments were carried out at least triplicates.

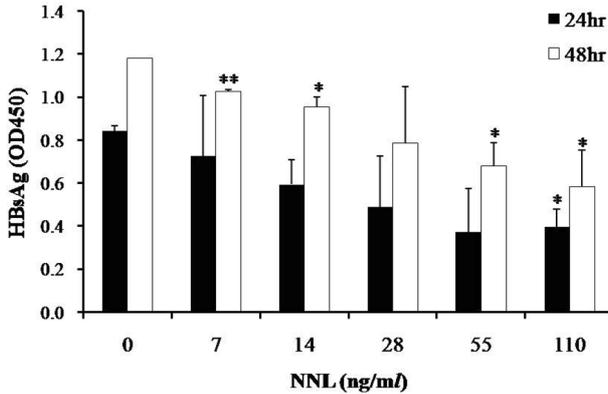


Fig. 2. Level of HBsAg in NNL-treated HepG2.2.15 cells. HepG2.2.15 cells were treated with various concentration of NNL for 24 hours and 48 hours and analyzed the level of HBsAg in the media with ELISA assay. * $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. control.

HBV의 증식도 억제 시키는지 관찰하기 위하여 배지로 분비되는 HBV의 DNA를 분석하였다. 기존의 HBV particle을 분리하여 DNA를 추출하는 방법을 이용하지 않고 배지를 PCR 반응의 주형으로 이용하여 DNA를 분석하는 실험 방법을 수행하였다. 무처리군 배지 5-10 μ l를 주형으로 하여 PCR 반응을 실시한 결과 매우 효과적으로 HBV DNA 발현을 분석할 수 있었으며, HBV를 분리하여 PCR로 분석한 방법과 PCR 산물을 비교한 결과, 두 실험군 간에 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다 (미발표 데이터). 그래서 배지를 주형으로 한 PCR 방법으로 NNL이 HBV의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다 (Fig. 3). NNL을 농도별로 처리하여 24시간, 48시간 배양 후 배지에 존재하는 HBV DNA를 분석한 결과, NNL은 바이러스 DNA 증식을 억제하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 3A). 세포내 HBV의 유전자 발현에 NNL이 어떠한

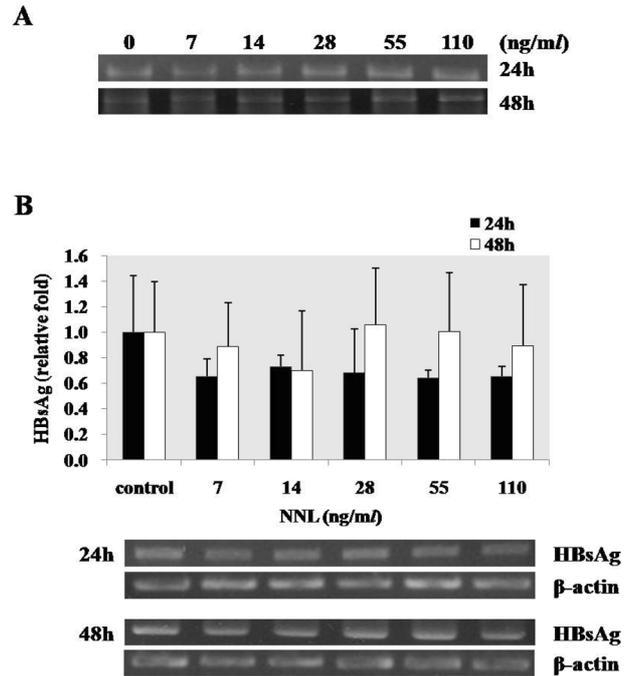


Fig. 3. Effect of NNL on hepatitis B virus replication and expression. (A) HepG2.2.15 cells were treated with various concentration of NNL for 24 hours and 48 hours and analyzed the level of HBV DNA with PCR analysis. (B) Total RNA was purified and analyzed the level of HBsAg mRNA with one-step RT-PCR analysis.

영향을 미치는지 분석하기 위하여 RNA를 분리하고 one-step RT-PCR 방법으로 HBsAg의 RNA 레벨을 분석한 결과, NNL은 HBsAg의 유전자 발현을 억제시키는 효능이 없음을 관찰하였다 (Fig. 3B). 이러한 실험 결과로부터 NNL에 의한 HBsAg의 생성 억제는 HBV의 증식이나 유전자 발현에 영향을 미치는 것이 assembly가 아니라 세포내에서 생성된 HBV 표면 항원이 세포 밖으로 분비될 때 영향을 미칠 것으로 추정하게 되었다. HBV의 표면 항원이 조립되어 분비될 때에 숙주 세포의 콜레스테롤 및 지질이 필요하다는 보고가 있다 (Lin *et al.*, 2003). HBsAg는 당단백의 일종으로 viral nucleic acid가 없어도 상당량이 혈청내로 분비되는 것으로 알려져 있다. HBsAg의 발현은 감염의 일반적인 현상으로 바이러스 핵산이 결합된 이러한 입자들은 감염과정에서 숙주세포의 표면항체의 기능을 저해할 것으로 여겨지고 있다. 즉, HBsAg의 경우 subviral lipoprotein particles로서 감염된 세포로부터 독립적으로 생성된다. HBsAg가 합성되어 분비될 때 100-200개의 폴리펩타이드가 결합하게 되며, 이때 지질성분은 phosphatidylcholine (~60%), cholesteryl ester (~14%), 콜레스테롤 (~15%) 그리고 triglyceride (~3%)로 구성되어 있는 것으로 보고되고 있다 (Gavilanes *et al.*, 1982). NNL이 HBsAg의 생성은 억제하나 HBV DNA 증식에는 영향을 미치지 않는 것으로부터

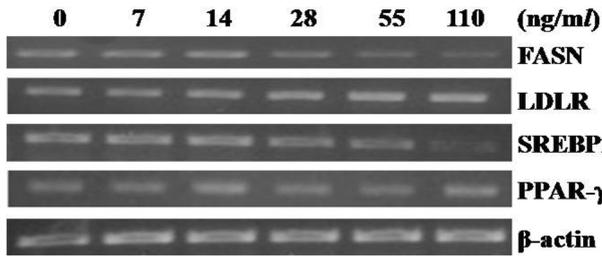


Fig. 4. Effect of NNL on the lipid metabolism-related gene expressions in HepG2.2.15 cells.

HepG2.2.15 cells were treated with various concentration of NNL for 24 hours and analyzed the expression of FASN, LDLR, SREBP2, and PPAR- γ with one-step RT-PCR. Normalization was performed with β -actin.

NNL이 지질 합성 유전자 발현을 조절하는지 여부를 분석하였다.

3. 지질대사 관련 유전자 발현 분석 및 지질함량 분석

지질대사에 관여하는 유전자 발현을 분석하기 위하여 HepG2.2.15 세포를 다양한 농도의 NNL을 처리하고 24시간 배양한 후 RNA를 분리하였다. 지질대사 관련 유전자인 fatty acid synthase (FASN)과 low density lipoprotein receptor (LDLR), sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2), peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ) 유전자의 발현을 RT-PCR 방법으로 분석하였다 (Fig. 4). 분석 결과 FASN과 SREBP2는 NNL에 의해 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것을 관찰하였다. LDLR 유전자의 경우 NNL 양에 따라 발현이 증가되는 양상을 나타내었다. PPAR- γ 의 경우 NNL 처리에 따른 일관성 있는 결과를 얻을 수가 없었다. FASN은 지방산 합성에 관여하는 중요한 효소로서 acetyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 팔미틱산을 합성하는 반응을 촉매한다. FASN의 발현 감소는 지방산 합성과정이 저해되는 것으로 추측할 수 있다. 또한 SREBP2는 콜레스테롤 생합성에 관여하는 유전자 발현을 조절하는 전사조절인자로서, SREBP2 유전자의 발현 감소는 콜레스테롤의 생합성의 감소와 관련이 있다 (Eberlé, 2004). FASN과 SREBP2의 감소는 간세포의 지질 생합성에 영향을 미쳐 HBsAg의 발현을 감소시킬 가능성이 매우 높음을 시사하고 있다. 흥미롭게도 LDLR 유전자의 발현은 NNL 농도에 따라 증가하였는데, LDLR은 low density lipoprotein (LDL)을 세포 내로 유입하는데 관여하는 유전자로 LDL은 혈액 내에 콜레스테롤 carrier로 작용하는 단백질이다. 따라서 LDLR 유전자는 혈액 내에 콜레스테롤 함량을 조절해 주는 중요한 유전자로 알려져 있다 (Kong *et al.*, 2006). LDLR 유전자의 기능 장애는 고지혈증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 FASN과 SREBP2 유전자가 발현 감소와 더불어 LDLR 유전자의 발현 증가는 NNL이 지질대사를 조절한다는 것을 반증한다고 하겠다. 그러나 PPAR- γ

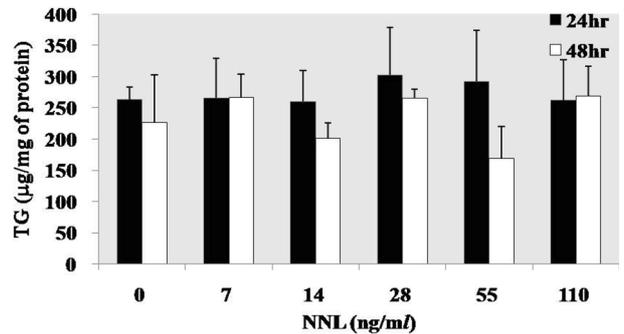


Fig. 5. Measurement of triglyceride (TG) content.

After HepG2.2.15 cells were treated with various concentration of NNL for 24 hours and 48 hours, the cells were harvested and sonicated. The cell lysates were measured the TG level using triglyceride and free glycerol reagents and normalized with the protein content. The TG content was indicated as μ g TG per mg of protein.

의 발현에 어떠한 영향을 미치는지는 추가 실험이 필요하다. NNL에 의한 지질대사 관련 유전자 발현 변화를 관찰한 후, NNL에 의해 HepG2.2.15 세포의 지질 함량에 변화가 있는지 알아보기 위하여 triglyceride (TG) 함량을 분석하였다 (Fig. 5). HepG2.2.15 세포에 NNL을 24시간과 48시간 처리한 후 추출한 세포 분획으로부터 TG 함량을 분석한 결과, 24시간 처리에서는 변화를 관찰할 수 없었으나, 48시간 처리군에서 55 ng/ml의 NNL을 처리하였을 때 TG 함량이 약 25% 가량 감소하는 것을 관찰하였으나, 통계학적 유의성은 관찰하지 못하였다.

이상의 결과로부터 NNL이 세포내 지질 함량에 직접적인 영향을 미치는 것 같지는 않으나 지질대사 관련 유전자의 발현에 영향을 미쳐 HBsAg의 생성을 억제하는 것이 아닌가 추정할 수가 있다. NNL에 의한 HBsAg 생성을 억제 시키는 효능과 나아가 항간염 효능 혹은 항고지질증 소재로서 NNL의 가능성을 예측해 볼 수 있으며, 이를 위해 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

LITERATURE CITED

- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P and Foufelle F. (2004). SREBP transcription factors: master regulator of lipid homeostasis. *Biochimie*. 86:839-848.
- Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM and Peterson DL. (1982). Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins.

- Journal of Biological Chemistry. 257:7770-7777.
- Jeong S, Yim HW, Bae SH and Lee W.** (2008). Changes of hepatitis B surface antigen seroprevalence in Korea, 1998-2005. Korean Journal of Epidemiology. 30:119-127.
- Jung HA, Jung YJ, Yoon NY, Jeong DM, Bae HJ, Kim D, Na DH and Choi JS.** (2008). Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase advanced glycation end products formation, and oxidative stress. Food and Chemical Toxicology. 46:3818-3826.
- Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen YP, Furukawa H, Itoigawa M, Fujioka T, Mihashi K, Cosentino LM, Morris-Natshke SL and Lee KH.** (2005). Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 13:443-448.
- Kim JH, Kim YS and Surh DJ.** (1994). The prevalence of HBsAg and anti-HCV in Korean patients with hepatocellular carcinoma. Korean Journal of Medicine. 46:181-190.
- Kim TG, Park MS, Han H, Kang SY, Jung KK, Rheu HM and Kim SH.** (1999) Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells. Yakhak Hoeji. 43:458-463.
- Kong WJ, Liu J and Jiang JD.** (2006). Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. Journal of Molecular Medicine. 84:29-36.
- Korba BE and Gerin JL.** (1992). Use of a standardized cell culture assay to assess activities of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. Antiviral Research. 19:55-70.
- Korba BE and Milman G.** (1991). A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. Antiviral Research. 15:217-228.
- Kuo YC, Lin YL, Liu CP and Tsai WJ.** (2005) Herpes simplex virus type 1 propagation in HeLa cells interrupted by *Nelumbo nucifera*. Journal of Biomedical Science. 12:1021-1034.
- Lin YL, Shiao MS, Mettling C and Chou CK.** (2003). Cholesterol requirement of hepatitis B surface antigen (HBsAg) secretion. Virology. 314:253-260.
- Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, Hasnian SS, Leung N, Lesmana L, Phiet PH, Sjalfoellah Noer HM, Sollano J, Sun HS and Xu DZ.** (2000). Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 15:1356-1361.
- Mukherjee PK, Saha K, Pal M and Saha BP.** (1997). Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. Journal of Ethnopharmacology. 58:207-213.
- Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A and Yajima H.** (2007). Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. Planta Medica. 73:1255-1259.
- Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S and Ohizumi Y.** (2006). Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology. 106:238-244.
- Wu MJ, Wang L, Weng CY and Yen JH.** (2003). Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gert.). American Journal of Chinese Medicine. 31:687-698.
- Yuk CS.** (1990) Coloured medicinal plants of Korea. Academy Book Co., Seoul Korea. pp. 219-230.