

고농도 포도당에 노출된 마우스 신장상피세포에서 桑枝의 산화 스트레스 억제 효과

장수영, 신현철

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Inhibitory Effect of Mori Ramulus on Oxidative Stress Induced by High Glucose in LLC-PK₁ Cells

Soo-young Jang, Hyeon-cheol Shin

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Gu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Recent etiological studies show that oxidative stress might play a major role in the diabetes and its complications. Mori Ramulus (MR) has been known to have antioxidative, anti-inflammatory and antidiabetic effects. The methanol extract of MR was tested for its effectiveness in LLC-PK₁ cells exposed to high glucose.

Methods : The cytoprotective effect of MR was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The antioxidative effect was measured in terms of generation amount of $\cdot O_2^-$ by 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), NO by 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), ONOO⁻ by dihydrorhodamine 123 (DHR 123) in the high glucose-treated LLC-PK₁ cells. Western blotting was performed using anti-AGE, anti-RAGE, anti-MAPKs(ERK1/2, JNK, p38), anti-PI3K, anti-Akt, and anti-NF- κ B (p50, p65) respectively.

Results : MR extract reduced cell death and inhibited the generation of $\cdot O_2^-$, NO, ONOO⁻ in the high glucose-treated LLC-PK₁ cells. MR inhibited the expression of AGE, RAGE, MAPKs, PI3K, and Akt by means of decreasing NF- κ B activation. MR also inhibited NF- κ B activation itself.

Conclusions : These results indicate MR has cytoprotective, antioxidative, and anti-inflammatory effects. Therefore it is suggested that MR might prevent and cure diabetes and its complications.

Key words : Mori Ramulus, Oxidative stress, AGE, MAPK, NF- κ B

1. 서 론

당뇨병으로 인한 만성적인 고혈당 상태는 포도당의 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 과정 중 미토콘드리아의 전자전달 과정, 글리세르알

데히드 자동산화(glyceraldehyde autooxidation), 최중당화산물(advanced glycation end product, AGE) 형성, protein kinase C의 활성화 등 여러 경로를 통해 과량의 활성산소를 생성하여 phosphoinositide 3-kinase(PI3K) 및 Akt와 Mitogen activated protein kinase(MAPK) 등의 인산화를 증가시키고 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발한다¹⁻⁶. 산화 스트레스란 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)·활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)의 발

· 교신저자: 신현철 경북 포항시 남구 대잠동 907-8번지
대구한의대학교 부속 포항한방병원 3내과
TEL: 054-281-0055 FAX: 054-281-7464
E-mail: ungaeshin@naver.com

생과 항산화 방어계 간에 심각한 불균형이 초래되는 상황을 말하며, 최근 당뇨병과 그 합병증의 중요한 발병 기전으로 주목받고 있다^{7,8}.

고혈당이 장기간 지속되면 비효소적 당화와 당산화 반응을 거쳐 당과 단백질의 복합체인 AGE를 형성하게 되고, 이는 신장과 안구 망막 등에서 당뇨병성 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 AGE는 최종당화산물 수용체(receptor for AGE, RAGE)와 결합해 ROS를 생산함으로써 nuclear factor kappa B(NF-κB)를 활성화하여 세포를 손상시킨다^{9,10}.

NF-κB는 대표적인 redox sensitive 전사인자로 알려져 있으며, 활성화되어 작용을 하는 모든 과정에 ROS가 관여하고 있음이 관찰되었다¹¹. 정상적인 상태에서 NF-κB는 세포질내에서 비활성화된 상태로 존재하다가 세포외 자극에 의해 활성화되면 핵내 표적 유전자와 결합하여 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), interleukin-6(IL-6) 등 여러 염증 매개물질의 전사를 촉진함으로써 다양한 조직과 세포에서 염증반응, 면역반응, 세포사멸에 중심적인 역할을 하므로 이를 조절할 수 있는 인자들은 치료적인 지표가 될 가능성이 높다^{12,13}.

桑枝는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 嫩枝를 건조한 것으로¹⁴, <本草圖經>¹⁵에 “脚氣風氣, 四肢拘攣.....利小便, 兼療口乾”이라고 수록되어 있으며, 祛風濕, 利關節, 行水氣 등의 효능으로 風寒濕痺, 四肢拘攣, 關節酸痛麻木, 脚氣浮腫 등에 상용되고 있다^{14,16}. 실험 연구에서는 항류마티스 관절염¹⁷, 지질대사 조절¹⁸ 효과가 보고되었으며, 특히 항산화¹⁹, 항염증²⁰, 항당뇨²¹ 효과가 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 이러한 桑枝의 효능이 당뇨병과 그 합병증 발생의 억제에 유효할 것으로 여겨지는 바 고농도 glucose에 노출시킨 마우스 신장상피세포에서 桑枝 추출물의 세포사 보호 효과, superoxide anion radical($\cdot O_2^-$), nitric oxide(NO), peroxynitrite(ONOO $^-$) 생성 억제, AGE, MAPKs, PI3K, Akt의

발현 및 NF-κB의 활성화 등에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 제

桑枝(Mori Ramulus, MR)는 대구한의대학교 부속한방병원 약제과에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

Dulbecco's Modifide Eagle Medium Nutrient Mixture F-12(DMEM/F12), fetal bovine serum(FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)에서, dihydrorhodamine 123(DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFDA)는 molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서, carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem(EMD Biosciences Inc., USA)에서, 4,5-diaminofluorescein(DAF-2)은 Daiichi Pure Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서, sodium dodesyl sulfate(SDS), acrylamide는 Bio-Rad(Hercules, USA)에서, NP-40, CAPS, Tris base, ammonium persulfate, ponceau, glycerol, protease inhibitors, bovine serum albumin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서, 1차 항체인 AGE는 Cosmo Bio(Cosmo Bio, Japan)에서, phospho-JNK, phospho-p38, phospho-Akt는 Cell Signaling Technology(Cell Signaling, USA)에서, phospho-ERK, RAGE, Akt, PI3K, phospho-PI3K, p50, p65, β-actin, histone H1과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat IgG는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용한 기기는 GENios(GENios-basic, Tecan, Austria), UV-VIS spectrophotometer(UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan)

를 사용하였다.

3) 세포

Mouse의 신장상피세포인 LLC-PK₁ 세포(renal epithelial cells)는 경북대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받아 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 桑枝 300 g에 3배 양의 95% methanol을 가하고 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압 농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 27.67 g(수율 9.22%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

LLC-PK₁ 세포를 100 mm dish(Corning Co., New York, USA)에 배양하였다. 이때 5% fetal bovine serum, L-glutamine(5.84 µg/ml)과 L-sodium bicarbonate(2.438 g/ml)를 함유한 DMEM/F12 배지에 penicillin-streptomycin(100 U/ml)을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) MTT assay

桑枝의 세포 독성 및 glucose에 의한 세포사로부터 桑枝의 세포 보호 효과를 알고자, Tada 등의 방법²²으로 측정하였다. LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 1×10⁴/well로 접종하여 24시간 배양하고 serum free 배지로 바꿔준 후, 桑枝 추출물을 농도별로 가하여 1시간 전처리한 다음 桑枝의 세포 독성을 측정하였다. LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 2×10⁴/well로 접종하여 24시간 배양하고 glucose를 최종농도 5 mM이 되도록 가하여 24시간 더 배양한 후 glucose를 최종농도 30 mM, 桑枝 추출물을 농도별로 가하여 24시간 더 배양한 후 桑枝의 세포 보호 효과를 측정하였다. 측정시에는 배지를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 세포에 가하여 4시간

추가 배양하고 solubilization 용액(dimethyl sulfoxide : ethanol, 1:1)을 가하여 24시간 배양한 후, 595 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

4) ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 소거능 측정

LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 1×10⁴/well로 분주한 후 하루 동안 배양한 다음 桑枝 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 후, glucose를 최종 농도 5.5 와 30 mM이 되도록 가하여 24시간 더 배양한 후 각 소거능을 측정하였다.

·O₂⁻ 소거능은 DCFDA assay²³로 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 된다. 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 200 µl와 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)로 희석한 0.125 mM DCFDA 50 µl를 첨가한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다.

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 생성하며 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. NO 소거능은 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 150 µl와 Dimethyl sulfoxide 550 µl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)로 1:400배로 희석한 DAF-2 50 µl를 첨가한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다²⁴.

ONOO⁻ 소거능은 Kooy 등의 방법²⁵에 의해 측정하였는데 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 20 µl와 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 µM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 µM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액(pH 7.4) 180 µl를 가하여 5분간 방치한 후

여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다.

5) Western blot analysis

LLC-PK₁ 세포를 100 mm dish에 24시간 배양한 후 桑枝 추출물을 농도별로 2시간 전처리하고 glucose를 최종 농도 5.5 와 30 mM이 되도록 하여 24시간 더 배양한 후 PBS로 세척하고 scraper로 모은 LLC-PK₁ 세포에서 cytosol, nuclear 단백질을 분리하여 염증인자 및 대사산물의 단백질 발현을 관찰하였다. 동일 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose membrane에 단백질들을 전이시켜 주었다. 이 membrane을 분리한 후 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단시키고 각 표적 단백질의 1차 antibody를 2시간 이상 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 60분간 세척한 다음 2차 antibody를 2시간 이상 반응시키고, TBST로 60분간 세척한 다음 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다.

6) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법²⁶과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

7) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's *t*-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 성적

1. 세포 독성 측정

桑枝를 농도별(25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였을 때 각각의 농도에서 103.27, 97.11, 87.46, 71.68, 49.27, 35.68, 33.01%의 생존율을 나타내어 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포 독성이 미약한 것으로 나타났다(Fig. 1).

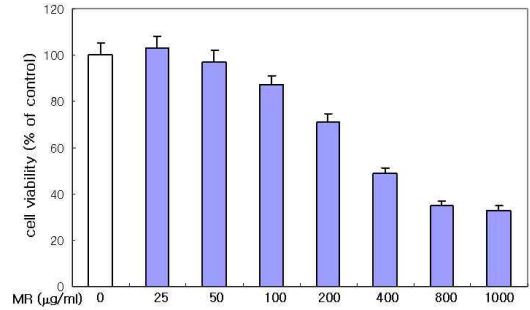


Fig. 1. Cytotoxic effect of Mori Ramulus(MR) in LLC-PK₁ cells.

Cells were exposed to MR(25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$). After 24 hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean \pm S.D.

2. 세포 보호 효과

Glucose 30 mM을 처리하였을 때 세포 생존율은 46.02%였으나, 桑枝 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 로 전처리한 경우에 생존율이 각각 49.27, 71.46, 75.87, 82.24, 65.38, 53.46, 31.94%로 나타나 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 농도 의존적으로 고농도 glucose에 의한 세포사를 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

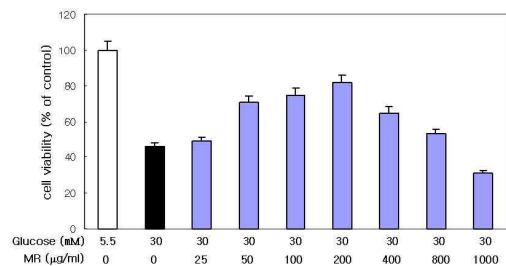


Fig. 2. Cytoprotective effect of Mori Ramulus(MR) on glucose-induced cell death in LLC-PK₁ cells.

Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$). After 24 hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean \pm S.D.

3. $\cdot O_2^-$, NO 및 ONOO $^-$ 생성에 미치는 영향

$\cdot O_2^-$ 는 정상 세포에서 77.85 ± 3.81 fluorescence/min 인데 비하여 glucose 처리에 의해 135.45 ± 6.12 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 桑枝 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 100 $\mu g/ml$ 농도에서 105.82 ± 5.11 fluorescence/min, 200 $\mu g/ml$ 농도에서 99.57 ± 3.87 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3).

NO는 정상 세포에서 56.4 ± 2.77 fluorescence/min 인데 비하여 glucose 처리에 의해 98.34 ± 5.24 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 桑枝 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 100 $\mu g/ml$ 농도에서 71.22 ± 4.03 fluorescence/min, 200 $\mu g/ml$ 농도에서 73.58 ± 4.28 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

ONOO $^-$ 는 정상세포에서 138.29 ± 7.11 fluorescence/min인데 비하여 glucose 처리에 의해 266.68 ± 10.27 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 桑枝 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 50 $\mu g/ml$ 농도에서 231.24 ± 10.89 fluorescence/min, 100 $\mu g/ml$ 농도에서 189.45 ± 7.33 fluorescence/min, 200 $\mu g/ml$ 농도에서 162.28 ± 8.00 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5).

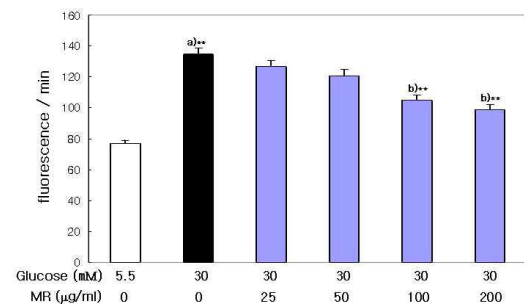


Fig. 3. Effect of Mori Ramulus(MR) on ROS generation in LLC-PK $_1$ cells.

Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100, 200 $\mu g/ml$). The generation of ROS was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean \pm S.D.
a) Significantly different from the normal.

b) Significantly different from the control(** p < 0.01).

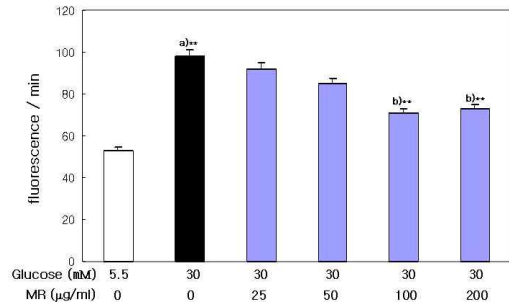


Fig. 4. Effect of Mori Ramulus(MR) on NO generation in LLC-PK $_1$ cells.

Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100, 200 $\mu g/ml$). The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. Results are mean \pm S.D.

a) Significantly different from the normal.
b) Significantly different from the control(** p < 0.01).

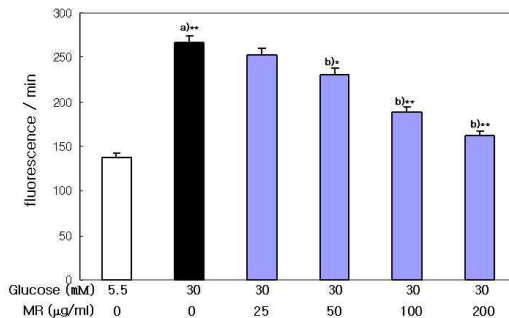


Fig. 5. Effect of Mori Ramulus(MR) on ONOO $^-$ generation in LLC-PK $_1$ cells.

Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100, 200 $\mu g/ml$). The generation of ONOO $^-$ was measured by DHR 123 fluorescence probe. Results are mean \pm S.D.

a) Significantly different from the normal.
b) Significantly different from the control(** p < 0.01, * p < 0.05).

4. AGE 및 RAGE 단백질 양에 미치는 영향

Western blot으로 AGE 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 glucose를 처

리한 대조군에서 증가되었으나 桑枝 추출물을 전처리하고 glucose를 처리한 실험군에서는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6A).

RAGE 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결

과 정상군에 비하여 glucose를 처리한 대조군에서 증가되었으나 桑枝 추출물을 전처리하고 glucose를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6B).

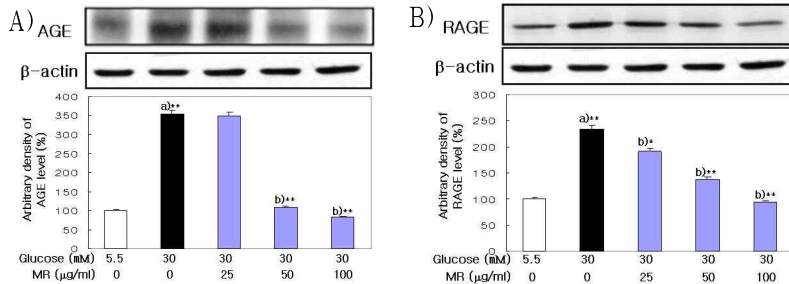


Fig. 6. Effect of Mori Ramulus(MR) on AGE and RAGE expression in LLC-PK₁ cells.

Western blot was performed to detect AGE and RAGE protein level in cytosol fractions from LLC-PK₁. Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Results are mean \pm S.D.

a) Significantly different from the normal.

b) Significantly different from the control(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). A : AGE protein. B : RAGE protein.

5. MAPKs에 미치는 영향

桑枝 추출물이 MAPKs에 미치는 영향을 검토하였다. MAPKs인 phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-p38의 발현 정도를 비교하여 관찰한 결과 정상군에 비하여 glucose를 처리한 대조군에서 증가되었

으나 桑枝 추출물을 전처리하고 glucose를 처리한 실험군에서 phospho-ERK, phospho-p38은 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되었고, phospho-JNK는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7).

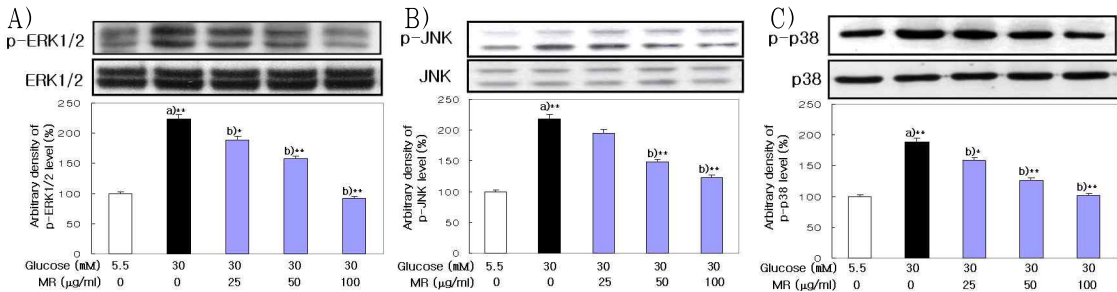


Fig. 7. Effect of Mori Ramulus(MR) on MAPK expression in LLC-PK₁ cells.

Western blot was performed to detect MAPK protein level in nuclear fractions from LLC-PK₁. Cells were exposed to glucose (5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Results are mean \pm S.D.

a) Significantly different from the normal.

b) Significantly different from the control(** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$). A : phospho-ERK protein. B : phospho-JNK protein. C : phospho-p38 protein.

6. PI3K 및 Akt 단백질 양에 미치는 영향

桑枝 추출물이 PI3K 및 Akt 단백질 발현에 미치는 영향을 검토하였다. 정상군에 비하여 glucose를 처리한 대조군에서 증가되었으나 桑枝 추출물

을 전처리하고 glucose를 처리한 실험군에서는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 8).

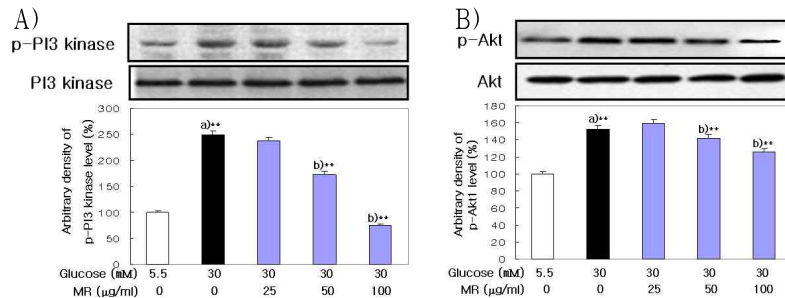


Fig. 8. Effect of Mori Ramulus(MR) on phospho PI3 kinase and phospho Akt expression in LLC-PK₁ cells.

Western blot was performed to detect phospho PI3 kinase and phospho Akt protein level in nuclear fractions from LLC-PK₁. Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Results are mean \pm S.D.

a) Significantly different from the normal.

b) Significantly different from the control(** : $p < 0.01$). A : phospho PI3 kinase, B : phospho Akt.

7. NF- κ B 단백질 양에 미치는 영향

桑枝 추출물이 ROS 감수성 전사인자인 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 핵내의 p50, p65 양을 관찰하였다. NF- κ B의 subunit인 p50, p65 핵내 양은 정상군에 비하여 glucose를 처

리한 대조군에서 증가되었으나 桑枝 추출물을 전처리하고 glucose를 처리한 실험군에서 p50은 농도의존적으로 유의성 있게 감소되었고, p65는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 9).

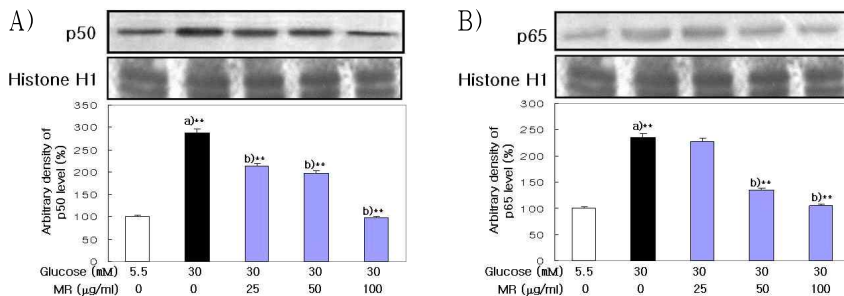


Fig. 9. Effect of Mori Ramulus(MR) on NF- κ B expression in LLC-PK₁ cells.

Western blot was performed to detect NF- κ B protein level in nuclear fractions from LLC-PK₁. Cells were exposed to glucose(5.5, 30 mM) in the presence and absence MR(25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Results are mean \pm S.D.

a) Significantly different from the normal.

b) Significantly different from the control(** : $p < 0.01$). A : p50 protein, B : p65 protein.

IV. 고찰

桑枝는 桑科(Moraceae)에 속하는 落葉喬木인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 嫩枝를 건조한 것으로 桑條, 子名椹 등의 異名이 있고, 味苦 性平無毒하며 肝經에 入한다^{14,16,27}. <本草圖經>¹⁵에 “療遍體風癢乾燥, 脚氣風氣, 四肢拘攣.....肺氣嗽, 消食, 利小便, 兼療口乾”, <東醫寶鑑>²⁸에 “治一切風, 療水氣.....消食, 利小便, 治臂痛, 療口乾”이라고 기재되어 있으며, 祛風濕, 利關節, 行水氣 등의 효능으로 임상적으로는 風寒濕痺, 四肢拘攣, 關節酸痛麻木, 脚氣浮腫 등의 치료에 상용되고 있다^{14,16,27}. 한편, 뽕나무의 잎(桑葉), 뿌리(桑白皮), 줄기(桑枝), 열매(桑椹子)는 淸熱, 利水, 止渴, 生津 등의 효능으로 消渴에 활용되고 있으며^{14,28}, 실험적으로도 혈당 조절 효과가 있는 것으로 보고되었다^{10,29}.

桑枝에는 tannin, stachyose, raffinose, xylose, mulberrin, morin, dehydromorin 등의 성분이 함유되어 있고, 특히 목질부에 함유된 morin은 항산화, 항염증 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있으며^{14,16,17}, 그 밖에 혈압강하, 진통, 해열, 소염, 항균 작용이 보고되었다³⁰.

관련 연구보고로 김¹⁸은 桑枝의 지질대사 조절 효과를 보고하였고, 노¹⁷는 콜라겐으로 관절염을 유발한 생쥐에 대해 桑枝의 항류마티스 관절염 효과를 밝혔으며, Zhang^{19,20}은 桑枝의 항염증 및 항산화 효과를 통해 진통제·항산화제로서의 가능성을 제시하였다. 또한 황²¹은 streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에서 桑枝가 당인산화 과정과 당분해 및 polyol pathway에 관여하는 효소의 활성을 억제하여 당뇨병의 치료에 유효할 것으로 보고하였다.

이에 桑枝가 당뇨병과 그 합병증에 효과를 나타낼 것으로 기대되어 본 연구를 시행하였다. 우선 桑枝 methanol 추출물의 세포 독성과 세포 보호 효과를 측정하였는 바 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포 독성이 미약하였고 세포 보호 효과도 농도 의존적으로 세포사를 저해하는 것으로 나타났다. 이로써 桑枝

는 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 고농도 glucose에 의한 세포사에 대해 세포 보호 효과가 있음을 알 수 있었으며, 이러한 특성을 고려하여 활성종 생성에 관한 실험에서는 桑枝의 농도를 각각 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로, AGE, RAGE, MAPKs, PI3K 및 Akt, NF- κB 에 미치는 영향에 관한 실험에서는 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 설정하였다.

ROS는 산소의 화학적 특성으로 인해 생성되는 것으로 $\cdot\text{O}_2^-$, hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) 등이 포함된다. 이들은 염증반응, 고혈압, 고지혈증에서 second messenger처럼 세포 신호전달 과정을 매개하고 직접적인 조직 손상을 유발하며 혈관 기능을 저하시킨다^{7,11}. 최근 연구에서 고농도 포도당 상태는 $\cdot\text{O}_2^-$ 와 NO를 과다 생산하는 것으로 보고되었으며, ROS들이 고혈당의 결과일 뿐만 아니라 신증, 망막병증, 신경병증 등과 같은 다양한 당뇨 합병증의 원인이 된다고 하였다³¹.

NO는 저농도에서는 혈관확장, 신경전달, 혈소판 응집 억제, 박테리아 및 암에 대한 독소 작용 등 중요한 생리적 조절인자로 작용하지만 고농도에서는 반응성 산화물질로 전환되어 염증을 유발해 세포를 손상시킨다. 또한 췌장 β cell의 기능을 저해하며 세포내 항산화 효소의 기능을 저하시키고, $\cdot\text{O}_2^-$ 와 상호작용하여 당뇨병과 관련된 산화성 손상을 일으키는 $\cdot\text{OH}$ 와 강력한 산화력을 지닌 ONOO⁻를 형성한다^{11,32,33}.

ONOO⁻는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질로서 $\cdot\text{OH}$ 와 같은 다른 toxic species를 분해하며, thiol과 lipid의 산화, 지질과 단백질의 nitrosation/nitration에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다^{7,31,33}.

본 연구에서는 桑枝 추출물로 처리한 LLC-PK₁ 세포에 다시 glucose를 처리하여 활성산소 및 활성

질소 생성계를 유도한 결과 $\cdot O_2^-$, NO, ONOO⁻의 생성이 농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다.

최근 당뇨병과 그 합병증을 비롯하여 동맥경화증, 고혈압, 알츠하이머 등에서 AGE의 농도가 증가되어 있음이 발견되었다. 정상 상태에서 단백질과 당은 비효소 반응인 Millard 반응을 통해 schiff base를 형성한 후 재배열되어 가역적인 amadori형의 초기당화산물을 생성한다. 그러나 고혈당 상태가 지속되면 amadori 산물이 분해되지 않고 재배열되어 AGE가 생성되며, 이는 혈당이 조절되어도 분해되지 않고 장기간 생존하면서 세포의 기질 단백질과의 비가역적인 교차결합이나 세포내 단백질 또는 핵산과의 최종당화산물을 형성하여 조직에 비정상적인 변화를 일으킨다. 특히 AGE는 세포 표면에 존재하는 RAGE와 결합해 ROS를 생산함으로써 NF- κ B를 활성화하여 세포 손상을 유발하게 된다^{9,10}.

본 실험에서는 세포내 산화 스트레스를 유발하는 AGE, RAGE가 고농도 glucose 처리로 증가되었으나 桑枝 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 억제되는 것을 관찰하였다.

MAPK는 유전자의 발현, 세포의 증식 및 분화, 사멸 등을 조절하는 단백질이며 세포의 자극이 세포막에 있는 수용체를 자극하면 이 신호를 핵으로 전달하는 과정에서 중요한 역할을 한다. MAPKs family로는 extracellular regulated kinase(ERK), c-jun N-terminal kinase(JNK), p38 등이 발견되었고, 이들은 인산화를 통해 여러 유전자들의 발현을 조절한다. ERK는 성장인자들에 의해 활성화되어 세포의 성장과 증식에 관여하고, JNK와 p38은 방사선 조사, heat shock, 염증성 cytokine과 같이 세포사멸을 유도하는 여러 인자들에 의해 활성화되어 염증반응, 세포사멸을 유도한다³⁴. 또한 MAPK는 inhibitory kappa B alpha(I κ B α)의 인산화를 통해 NF- κ B를 활성화시킨다³⁵.

PI3K는 세포막 구성 성분인 phosphoinositide의 지질 성분을 인산화시키는 lipid kinase로서, second

messenger를 생성하여 Akt 등의 여러 하위 신호전달체계를 활성화시켜 세포이동, 혈관신생, 세포성장과 증식, 세포사멸, 포도당대사와 같은 세포 작용에 관여한다. Akt는 protein kinase B(PKB)라고도 불리며 PI3K의 하방향(downstream)에 위치하여 PI3K에 의해 조절된다³⁶⁻³⁹. 인슐린의 당대사 과정과 관련하여 PI3K가 활성화되어 phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate(PIP₃)가 형성되면 세포질에 존재하던 Akt가 세포막으로 전위되어 활성화된다⁴⁰⁻⁴³. 활성화된 Akt는 GLUT4를 세포막으로 이동시키는데 관여하여 인슐린 자극에 의한 인슐린 표적 세포 내로의 당 유입을 증가시키므로 glucose 대사 및 수송과 같은 혈당 조절에 중요한 역할을 하게 된다⁴⁴. 또한 최근 연구에서 PI3K/Akt를 통한 신호전달이 MAPK나 NF- κ B와 같은 전사인자들의 활성을 촉진시킨다는 연구 결과가 보고되고 있다⁴⁵.

본 연구에서 MAPKs에 미치는 영향을 검토한 결과 phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-p38의 발현이 고농도 glucose 처리에 의해서 증가되었으나 桑枝 추출물 처리에 의해서 농도 의존적으로 감소되었다. 또한 NF- κ B를 활성화시키는 또다른 신호전달체인 PI3K 및 Akt 단백질 발현에 대한 실험에서도 고농도 glucose를 처리한 경우에는 그 양이 증가되었으나 桑枝 추출물 처리에 의해서 유의성 있게 감소되었다.

NF- κ B는 염증매개 cytokine의 발현에 중추적인 역할을 담당하는 공통경로(conversing pathway)로 이해되고 있다. NF- κ B는 p50과 p65로 이루어진 이종이합체(heterodimer)로서 세포질에서는 inhibitory kappa B(I κ B)라고 불리는 저해성 분자에 의해 불활성화된 상태로 존재하다가 세포의 자극에 의해 MAPK와 PI3K/Akt pathway가 활성화되어 I κ B kinase complex가 자극되면 I κ B가 붕괴되면서 NF- κ B가 핵내로 전위된다. 이후 NF- κ B를 binding site로 가지는 COX-2, iNOS, tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), IL-6 등의 여러 유전자를 발현시키게

된다^{12,13}. 이와 같이 NF- κ B는 주로 염증, 면역과 세포증식에 관여하는 유전자 발현을 조절하여 노화, 암, 동맥경화증, 바이러스성 복제, 급성 염증상태, 조직이식 거부반응, 독성·부패성 조직 손상 등의 여러 가지 병리적인 상태와 관련이 있는 것으로 보고되어 있다⁴⁶.

본 실험에서 ROS 전사인자인 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 검토한 결과 고농도 glucose 처리에 의해 핵내의 p50, p65의 양이 증가되었으나 桑枝 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 桑枝는 고농도 glucose 처리에 의한 세포사를 저해하였고, $\cdot O_2^-$, NO, ONOO $^-$ 의 생성을 억제하였으며, 고농도 glucose 처리로 증가된 AGE, RAGE를 감소시켰다. 또한 NF- κ B를 활성화시키는 신호전달체인 MAPKs, PI3K 및 Akt와 NF- κ B의 subunit인 핵내 p50, p65 양을 억제함으로써 NF- κ B의 활성화를 억제하였다. 이상의 결과로 桑枝는 산화 스트레스를 억제하며 당뇨병 및 그 합병증의 조절 약물로 유효하게 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

桑枝 추출물이 LLC-PK₁ 세포에서 고농도 glucose 처리에 의한 세포사, 산화 스트레스 및 NF- κ B 활성 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 $\cdot O_2^-$, NO, ONOO $^-$ 와 AGE, RAGE, MAPKs, PI3K 및 Akt, NF- κ B의 발현을 관찰하였다.

桑枝 추출물은 고농도 glucose 처리에 의한 세포사를 저해하여 세포 생존율을 증가시켰다. 또한 고농도 glucose 처리로 유도한 $\cdot O_2^-$, NO, ONOO $^-$ 생성이 桑枝 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되었으며, 증가된 AGE, RAGE, MAPKs, PI3K 및 Akt, NF- κ B 단백질 발현도 유의성 있게 억제되었다.

이상의 결과로 桑枝 추출물은 산화 스트레스를 억제하고 당대사를 조절하여 당뇨병과 그 합병증

의 조절 약물로 작용할 수 있는 가능성이 시사되었다.

참고문헌

- Han ST, Jeong JC. Effects of Cheonghyul-san on blood Glucose, hyperlipidemia, polyol pathway and reactive oxygen species in ob/ob mice. *동의생리병리학회지*. 2008;22(2):350-6.
- Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(33):30010-8.
- Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A, et al. Probulcol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002;57(1):1-10.
- Laybutt R, Hasenkamp W, Groff A, Grey S, Jonas JC, Kaneto H, et al. Beta-cell adaptation to hyperglycemia. *Diabetes*. 2001;50(1):180-1.
- 원규장. 고농도 포도당에 노출된 췌장 소도 베타 세포에서 산화 스트레스 당뇨병. 2004;28(4):250-4.
- Kim YH. Role of high glucose in proliferation of embryonic stem cell. 전남대학교. 박사학위논문. 2008.
- 임동건. 산화 스트레스 : 활성산소종과 산화질소. *대한중환자의학회지*. 2004;19(2):81-5.
- An YS, Kwon JH, Kang YH, Kim IJ, Kim YK, Son SM. Migration of vascular smooth muscle cells by high glucose is reactive oxygen dependent. *Korean Diabetes J*. 2008;32:185-95.
- 김영숙, 이윤미, 김찬식, 손은진, 장대식, 김진숙. 복합한약제제 KIOM-79의 STZ 유도 당뇨 모델에서의 최종당화산물 생성 및 Type IV collagen 및 TGF- β 1의 발현 억제 효과. *생약학회지*. 2006;

- 37(2):103-9.
10. Lee MD, Jeong JC. Effects of Mori Fructus on hyperglycemia, hyperlipidemia, polyol pathway, AGE and RAGE in ob/ob mice. *동의생리병리학회지*. 2009;23(2):351-9.
 11. Kim HY, Park JY. Oxidative stress and atherosclerosis. *대한내분비학회지*. 2000;15(1):1-14.
 12. 박승재, 신지선, 조용, 조영욱, 안은미, 백남인, 등. Kaempferol-3-O- β -D-sophoroside의 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 억제를 통한 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2 및 cytokine들의 발현 저해 효과. *생약학회지*. 2008;39(2):95-103.
 13. 이상민, 김윤경, 황윤하, 이창훈, 이희석, 이춘택, 등. 폐 상피세포에서 PI3K/Akt 경로가 I κ B/NF- κ B 경로의 활성화에 미치는 영향. *결핵 및 호흡기질환*. 2003;54(5):551-62.
 14. 전국한의과대학 본초학교수 共編著. *본초학*. 서울: 영림사; 2000, p. 274-5.
 15. 蘇頌編選, 尙志鈞輯校. *本草圖經*. 合肥: 安徽科學技術出版社; 1986, p. 380.
 16. 江蘇新醫學院 編著. *중약대사전*. 서울: 도서출판정담; 1999, p. 2181-2.
 17. 노성수, 구세광, 서영배. 상지가 콜라겐 유발 관절염 랫트에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2009;23(5):1106-15.
 18. Kim HS, Jeong JC. Effects of Ramulus mori extract on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *대한한의학회지*. 2002;23(4):64-72.
 19. Zhang Z, Jin J, Shi L. Antioxidant properties of ethanolic extract from Ramulus mori(Sangzhi). *Food sci technol int*. 2009; 15:435-44.
 20. Zhang Z, Shi L. Anti-inflammatory and analgesic properties of cis-mulberroside a from Ramulus mori. *Fitoterapia*. 2010;81(3):214-8.
 21. 황정구. Streptozotocin으로 유도한 고혈당 흰쥐에서 혈당 조절 및 당 대사 효소 활성화에 미치는 상지의 효과. *동국대학교 대학원 석사학위논문*. 2005.
 22. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986;93(2):157-65.
 23. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem*. 1983;134:111-6.
 24. Nagata N, Momose K, Ishida Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein. DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem Tokyo*. 1999;125:658-61.
 25. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 1994;16:149-56.
 26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
 27. 이상인. *본초학*. 서울: 의약사; 1992, p. 430.
 28. 허준. *東醫寶鑑*. 서울: 법인문화사; 2005, p. 556, 1324.
 29. Kim OG, Jeong JC. Effects of the Mori folium extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *동국대학교 대학원 석사학위논문*. 2004.
 30. 류경주, 김성수, 신현대. 상지의 효능에 관한 실험적 연구. *동의물리료법과학회지*. 1992;2(1):35-44.
 31. Yokozawa T, Kim YA, Kim HY, Lee YA, Nonaka GI. Protective effect of persimmon peel polyphenol against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK₁ cells. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:1979-87.
 32. 이종민, 김재우. R28 세포에서 고평도당이 반응성산소종의 생성에 미치는 영향. *대한안과학회*

- 지. 2010;51(5):746-50.
33. 정혜영, 성도유, 김에라, 최혜리, 김현진, 최재수, 등. ONOO⁻의 생성, 독성, 제거 및 노화와 관련성. 한국노화학회지. 2000;10(1):26-59.
 34. 현미선, 우원홍, 허정무, 김동호, 문연자. Berberine에 의한 HepG2 세포의 사멸과정에서 활성기산소와 p38 MAP kinase의 역할에 관한 연구. J. Korean Soc. 2008;51(2):129-35.
 35. Mendes AF, caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Role of mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases on IL-1-Induced NF-kappa B activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes. *Nitric Oxide*. 2002;6:35-44.
 36. Condliffer AM, Cadwallader KA, Walker TR, Rintoul RC, Cowburn AS, Chilvers ER. Phosphoinositide 3-kinase : a critical signaling event in pulmonary cells. *Resper Res*. 2000;1:24-9.
 37. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501.
 38. Burgering BMT, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 2002;376:559-602.
 39. Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J*. 1995;14(17):4288-95.
 40. Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC. Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *J Biol Chem*. 2005;280:5581-7.
 41. Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1996;271:30835-9.
 42. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275:661-4.
 43. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate dependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998;279:710-4.
 44. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 1996;271:31372-8.
 45. Tai YT, Podar K, Mitsiades N, Lin B, Mitsiades C, Gupta D, et al. CD40 induces human multiple myeloma cell migration via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/NF-kappa B signaling. *Blood*. 2003;101(7):2762-9.
 46. Sung BK, Chung HY. Significances of molecular inflammation and energy metabolism during aging. *CaPR*. 2005;10(1) :6-17.