

Alloxan에 의한 HIT-T15 세포의 산화적 손상에 대한 매실 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) 주정추출물의 세포보호효과

김인혜, 김종배¹, 조강진, 김재현, 엄애선^{1*}

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, ¹한양대학교 식품영양학과

Cytoprotective Effect of Ethanol Extract from Maesil (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) on Alloxan-induced Oxidative Damage in Pancreatic-cell, HIT-T15

Inhye Kim, Jong-Bae Kim¹, Kangjin Cho, Jae-Hyun Kim and Ae-Son Om^{1*}

Functional food & Nutrition Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-853, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract - The present study was designed to examine the potential antidiabetic and antioxidant effect of ethanol extract from *Prunus mume* fruit (PME) against alloxan-induced oxidative stress in pancreatic β -cells, HIT-T15. To evaluate the antidiabetic effect of PME, 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell proliferation assay, lactate dehydrogenase (LDH) release assay, NAD^+ / $NADH$ ratio and insulin secretion were assessed. We also measured its antioxidant effect against alloxan-induced oxidative stress in the cells by assessing the levels of the antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx). The results of this analysis showed that alloxan significantly decreased cell viability, increased LDH leakage, and lowered NAD^+ / $NADH$ ratio and insulin secretion in HIT-T15 cells. However, PME significantly increased the viability of alloxan-treated cells and lowered LDH leakage. The intracellular NAD^+ / $NADH$ ratio and insulin secretion were also increased by 1.5~1.9-fold and 1.4-fold, respectively, after treatment with the PME. The HIT-T15 cells treated with alloxan showed significant decreases in the activities of antioxidant enzymes, while PME significantly elevated the levels of antioxidant enzymes. Based on these results, we suggest that PME could have a protective effect against the cytotoxicity and dysfunction of pancreatic β -cells in the presence of alloxan-induced oxidative stress.

Key words - *Prunus mume*, Antidiabetes, Antioxidant, Alloxan, HIT-T15 cell

서 언

우리나라의 급격한 경제성장은 생활양식의 변화와 식습관의 서구화를 초래하였으며 이로 인해 암 및 비만 등의 대사증후군 등의 발병률이 급증하고 있다. 특히 현대인들의 식습관과 관련된 만성질환 중 하나인 당뇨병 유병률은 우리나라의 경우, 1970년대 2%에 불과하였으나 1990년대 초부터 10%에 육박하고 있다(Park and Baik, 2009). 지난

2003년 우리나라 당뇨병 환자수는 전 인구의 5.9%인 약 286만 명으로 추정되었으며 이와 같은 추세라면 2010년 351만 명(전 인구의 7.1%), 2030년 545만 명(전 인구의 10.9%)으로 빠르게 증가할 것으로 예상되고 있다(Kim and Choi, 2009). 당뇨병은 협심증 등의 심혈관계 합병증, 족부 절단 등의 말초동맥 폐쇄질환, 당뇨병성 망막변성 등과 같은 당뇨병성 안질환 및 당뇨병성 신증과 같은 심각한 합병증을 유발하여 삶의 질 저하와 사망을 이르게 한다. 이로 인한 당뇨병환자의 건강보험 진료비는 3조 1853억 원으로 전체 총 진료비의 19.2%로 1/5를 차지하고 있다. 또한 직

*교신저자(E-mail) : aesonom@hanyang.ac.kr

접미 외에 당뇨병의 합병증 등으로 발생하는 생산비 감소 등과 같은 간접비용까지 고려한다면 당뇨병으로 인한 사회경제적 비용은 급증할 것으로 추정된다(Moon *et al.*, 2008).

당뇨병은 주로 면역학적 기전에 의해 췌장베타세포가 파괴되어 인슐린 생산을 못하는 제1형 당뇨병(인슐린 의존형)과 체내에서 인슐린이 생산되기는 하나 인슐린저항성이 증가하는 제2형 당뇨병(인슐린 비의존형)으로 분류한다. 그러나 제2형 당뇨병에서도 혈당에 반응하는 인슐린 분비와 베타세포질량(β -cell mass)이 감소되는 특징을 보인다. 베타세포의 인슐린 분비능이 강화되고 베타세포질량이 증가하여 인슐린저항성을 보상할 정도라면 정상혈당이 유지된다. 그러나 유전적 또는 환경적 요인에 의해 당뇨병 감수성이 높은 사람들은 체내에서 필요한 만큼의 인슐린 공급이 원활하지 않아 결국에는 당뇨병으로 발전하게 된다(Choi and Woo, 2010). 현재까지 우리나라에서 수행된 다양한 단면연구 및 추적연구에서도 췌장베타세포 기능 저하에 따른 인슐린 분비능 저하가 한국인 제2형 당뇨병 발생과 악화에 관여하는 주요 원인 중 하나일 것으로 예상하고 있다(Kim, 2008). 최근 이와 같은 제2형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 분비 감소는 베타세포의 자가사멸(apoptosis)에 의한 베타세포질량의 급격한 감소로 인한 것으로 보고되고 있다(Butler *et al.*, 2003; Lupi and Del Prato, 2008). 또한 베타세포의 자가사멸은 고농도의 포도당에 의해 촉진되며 포도당에 장시간 노출 시에는 인슐린 유전자 발현도 감소시킨다(Jung *et al.*, 2010). 고농도의 포도당은 유리지방산과 함께 산화스트레스를 유발하고 이로 인해 발생된 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종(Reactive nitrogen species, RNS)에 의해 베타세포의 자가사멸을 유도시킨다(Donath *et al.*, 2005). 따라서 비정상적인 상태에서 증가된 활성산소종과 활성질소종을 제거하기 위해서는 체내 항산화 방어체계(antioxidant defense system)가 원활하게 조절되어야 한다. 항산화 방어체계는 항산화 물질과 항산화 효소로 구성되며 산화성 물질을 무독화시킨다. 항산화 물질로는 glutathione, 비타민 C와 E 등이 있으며 항산화 효소에는 superoxide dismutase(SOD), glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR) 및 glutathione peroxidase(GPx) 등과 같은 glutathione dependent enzyme 등으로 구성된다(Doh *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011).

매실은 장미과(Rosaceae)에 속하는 매화나무(*Prunus mume Sieb. Et Zucc.*)의 열매로 원산지는 중국 사천성과 호북성의 산간지로 알려져 있다. 한국, 일본 및 중국 등지에서 널리 분포하고 있으며 예로부터 장아찌, 주류 및 차 등의 식품이나 약재로 이용되었다. 한방에서는 식욕증진, 피로회복, 간기능 향상, 소화불량 및 구충 등의 효과가 있어 널리 사용되었다(Seo *et al.*, 2008). 최근에는 치아부식 및 치주질환을 발생시키는 구강병원균에 대한 항균활성 및 *Helicobacter pylori* 억제 효과 등이 보고됨에 따라 기능성 식의약품 소재로의 가능성이 높아지고 있다(Enomoto *et al.*, 2010; Seneviratne *et al.*, 2011). 또한 매실에는 구연산, 베타카로틴 및 비타민 E 등과 같은 천연 항산화 성분이 풍부하고 항산화 활성 등이 보고되고 있으나(Chung *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004), 매실을 이용한 당뇨병 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 매실주정추출물(*Prunus mume* extract, PME)의 항산화 효과를 통해 췌장베타세포의 세포보호, 손상 억제 및 인슐린 분비능을 검증함으로써 산화스트레스로부터 췌장베타세포를 보호하여 당뇨병 조절에 도움이 되는 기능성 식품 소재 개발을 위한 가능성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험의 세포배양에서 사용된 시약은 GIBCO사(Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 사용하였다. 실험방법 중 특별한 언급이 없는 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

매실주정추출물 (PME) 제조

매실은 2009년에 수확된 국내산으로 경기도 수원 시중에서 구입하였다. 씨를 제거한 매실 과육 약 100 g을 동결 건조한 후 분말화하였다. 분말 시료 10 g에 80% 주정 400 ml을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 2)가 깔려 있는 Buchner funnel을 통과시켜 감압 여과하였다. 80% 주정 추출물은 50°C 수온의 rotary vacuum evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조하였다. 추출물은 dimethyl sulphoxide(DMSO)에 용해시킨 후 배지에 필요한 농도로 희석하여 실험에 사

용하였다. 세포배양에 처리된 DMSO의 최종농도는 0.02% 이하가 되도록 하였다.

세포배양

본 연구에서는 햄스터 췌장베타세포주인 HIT-T15 세포를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. HIT-T15 세포는 10% fetal bovine serum(FBS) 및 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 (11.1 mM glucose 포함) 배지로 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 약 70%의 세포밀도(confluence)에 이르면 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 계대배양하였다.

MTT assay

세포생존율은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay로 측정하였다. HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10^5 /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하였다. PME의 세포독성을 알아보기 위하여, PME를 각각 100, 250, 500 및 1,000 µg/ml의 농도로 세포에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 각 well 마다 5 mg/ml MTT를 20 µl씩 가한 후 4시간 동안 배양하였다. MTT가 들어있는 배지를 제거한 후 150 µl DMSO를 가하고 30분간 배양하였다. 세포 내 formazan crystal을 용해시켜 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Alloxan에 대한 세포 보호 효과

HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10^5 /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하였다. 여기에 각 well 당 1 mM alloxan과 100, 250 및 500 µg/ml의 PME를 각각 세포에 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 세포생존율은 MTT colorimetric assay에 의해 측정하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10^5 /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하였다. 여기에 각 well 당 1 mM alloxan과 100, 250 및 500 µg/ml의 PME를 각각 세포에 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 세포로부터 방출된 LDH는 LDH cytotoxicity detection kit(Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)를 사용하여 측정하였다.

NAD⁺/NADH 함량 측정

HIT-T15 세포를 24 well plate에 2×10^5 /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하였다. 각 well 당 1mM alloxan과 100, 250 및 500 µg/ml의 PME를 각각 세포에 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 cold -PBS로 세포를 세척한 후 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 세포를 수거하였다. 세포 내 NAD⁺/NADH ratio는 NAD⁺/NADH Quantification kit(Biovision, Mountain View, USA)를 사용하여 측정하였다.

인슐린 분비능 측정

HIT-T15 세포를 24 well plate에 2×10^5 /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하였다. 여기에 각 well 당 1 mM alloxan과 100, 250 및 500 µg/ml의 PME를 각각 세포에 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, cell culture supernatant를 수거하여 Mouse Insulin kit(Shibayagi, Shibukawa, Japan)으로 측정하였다.

항산화효소 활성 측정

HIT-T15 세포를 24 well plate에 2×10^5 /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하였다. 각 well 당 1 mM alloxan과 100, 250 및 500 µg/ml의 PME를 각각 세포에 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 세포를 수거하여 항산화효소 키트 제조회사(Cayman chemical Co., Ann Arbor, USA)의 설명서에 따라 superoxide dismutase(SOD), glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR) 및 glutathione peroxidase(GPx) 활성을 측정하였다. 각 항산화효소 활성은 µg당 단백질로 계산하였으며 단백질 정량은 Bradford에 의한 방법으로 Bio-Rad protein assay 시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)을 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균(mean) ± 표준오차(standard error, SE)로 표시하였다. 각 군 간의 통계적 유의성 검증은 일원 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였고 $p < 0.05$ 유의수준에서 사후 검정으로 Duncan's multiple range test(DMRT)로 분석하였다. 모든 통계분석은 SPSS version 12.0 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

PME의 제조

씨를 제거한 신선한 매실 과육 100 g을 -80°C에서 건조하여 14.8 g(수율 14.8%)의 동결건조 시료를 얻었다. 동결건조한 매실 시료를 분말화한 시료 10 g을 80% 주정으로 추출 후, 농축 및 동결건조하여 6.54 g의 PME가 제조되었다(수율 65.4%). 즉, 본 실험에서 사용한 시료는 씨를 제거한 신선한 매실 100 g으로부터 6.54 g의 PME가 얻어졌으며 최종적인 수율은 6.54%로 나타났다.

PME 처리 농도에 따른 HIT-T15 세포생장률

PME가 HIT-T15 세포의 증식에 미치는 효과를 알아보

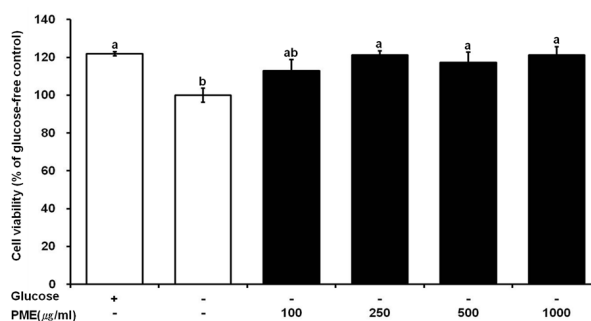


Fig. 1. Effect of the PME on cell viability of HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with PME for 24 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The cell viability treated with PME was assessed by MTT assay. The cell density was measured at 540 nm wavelength by the microplate reader. Untreated and glucose-free controls are treated only 0.02% DMSO. Data are representative of three independent experiments as mean ± SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$.

기 위해 100~1,000 µg/ml의 농도로 처리하여 세포생장률을 조사하였으며 대조군에 대한 비율로 나타내었다(Fig. 1). 24시간 배양 후, 포도당이 들어있는 않는 대조군의 세포생장은 11 mM 포도당 함유 처리군에 비해 약 21.9% 감소하였다(11 mM glucose, 121.9 ± 1.1; glucose-free, 100.0 ± 3.7). 반면, 250 µg/ml 이상의 농도로 PME를 처리했을 때, 포도당이 들어있는 않는 대조군에 비해 세포생장이 17.5~21.2% 가량 유의적으로 증가하였다(PME100, 112.8 ± 6.1; PME250, 117.5 ± 5.4; PME500, 121.2 ± 4.5). 본 연구에서는 배지 자체에 들어있는 포도당의 효과를 최소화하고 시료에 의한 효과를 단독으로 보고자 11 mM 포도당 처리군, 포도당이 들어있는 않는 대조군 및 포도당이 들어있는 않는 배지에 시료를 포함한 세포처리군으로 실험하였다. 선행연구에서 포도당 유/무에 따른 HIT-T15 세포생장률을 확인한 결과, 48시간 배양 후 세포생장이 유의적으로 감소함에 따라 다음 실험 조건을 시료 처리 농도 100~500 µg/ml 농도에서 24시간 배양으로 설정하였다(data not shown).

Alloxan에 대한 PME의 HIT-T15 세포보호효과

췌장베타세포를 선택적으로 파괴하는 alloxan과 PME를 동시에 처리하여 PME에 의한 HIT-T15 세포보호효과

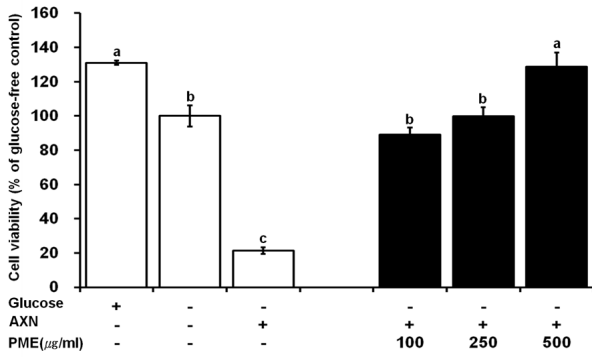


Fig. 2. Effect of the PME on cell viability of alloxan-treated HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then PME for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The cell viability treated with PME was assessed by MTT assay. The cell density was measured at 540 nm wavelength by the microplate reader. Untreated and glucose-free controls are treated only 0.02% DMSO. Data are representative of three independent experiments as mean \pm SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$.

를 MTT assay에 의해 확인하였다(Fig. 2). 포도당이 들어 있는 않는 대조군을 100%로 보았을 때, 11 mM 포도당 함유 처리군은 31% 정도 유의적으로 세포생존이 증가된 반면, alloxan 처리 시에는 세포생존이 78.6% 가량 유의적으로 감소하였다(11 mM glucose, 131.0 ± 1.2 ; glucose-free, 100.0 ± 6.3 ; AXN, 21.4 ± 1.9). 그러나 PME를 alloxan과 동시 처리했을 때, alloxan 단독 처리군에 비해 세포생장률이 약 4.2~6.0배 정도 유의적으로 증가하였다(PME100, 89.1 ± 4.2 ; PME250, 99.7 ± 5.3 ; PME500, 128.9 ± 8.2). Alloxan은 cyclic urea derivative로 제1형 당뇨병 유발물질로 실험에서 널리 사용되며 주로 베타세포에만 선택적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 흡수된 alloxan은 베타세포의 혈당센서(glucose sensor)인 glucokinase를 억제하여 인슐린 분비를 억제시키고 활성산소종을 발생시켜 베타세포 사멸을 유도한다(Lenzen, 2008). 따라서, 본 연구에서는 PME가 HIT-T15 세포에서 alloxan에 의해 발생하는 활성산소종을 조절함으로써 강력한 산화스트레스로부터 HIT-T15 세포를 보호한 것으로 사료된다.

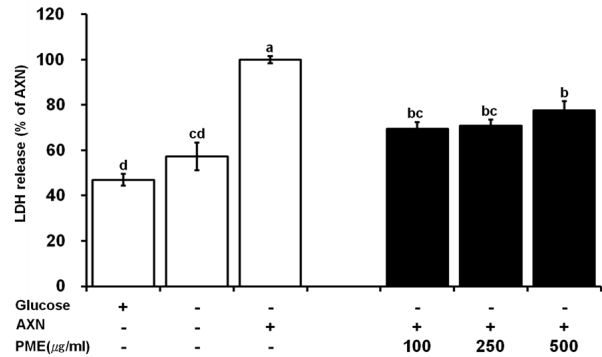


Fig. 3. Effect of the PME on LDH release of alloxan-treated HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then PME for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The LDH release was measured by LDH cytotoxicity kit as described in the Materials and methods section. Untreated and glucose-free controls are treated only 0.02% DMSO. Data are representative of three independent experiments as mean \pm SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$.

PME 처리가 HIT-T15 세포의 LDH 방출에 미치는 영향

Alloxan에 대한 PME의 LDH 방출량에 미치는 영향을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 포도당이 들어있는 않는 대조군에 비해 alloxan을 단독 처리한 HIT-T15 세포는 42.8% 정도 유의적으로 LDH 방출량이 증가함을 확인하였다. 그러나 alloxan과 함께 PME 100, 250 및 500 µg/ml을 처리한 결과, LDH 방출량이 alloxan 단독 처리군에 비해 각각 30.5, 29.2 및 22.4% 가량 유의적으로 감소함을 보였다. 세포가 손상을 받으면 세포막 파열로 인해 LDH 방출이 증가하며 이 때 발생하는 세포사멸은 주로 세포괴사(necrosis)에 따른 것으로 보고되고 있다(De La Pea *et al.*, 2007). 따라서 본 실험의 결과에서 alloxan 처리 시 발생하는 LDH 함량의 증가는 HIT-T15 세포괴사가 증가하여 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 그러나 PME 처리에 의해 LDH 방출량이 감소하고 있음을 확인함에 따라 PME가 alloxan으로 유발된 췌장베타세포 손상을 보호함으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 사료된다.

HIT-T15 세포 내 NAD⁺/NADH ratio 측정

Alloxan과 함께 PME를 처리하여 HIT-T15 세포의 NAD⁺

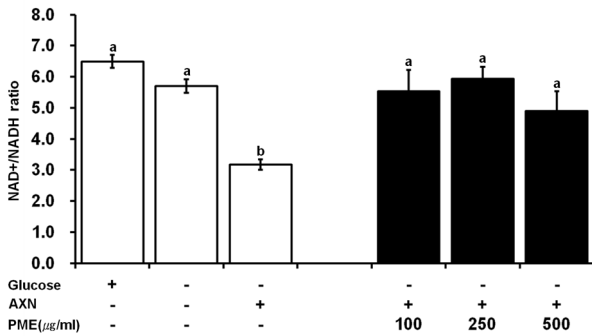


Fig. 4. Effect of the PME on NAD⁺/NADH ratio of alloxan-treated HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then PME for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The NAD⁺/NADH ratio was measured by NAD⁺/NADH Quantification kit as described in the Materials and methods section. Untreated and glucose-free controls are treated only 0.02% DMSO. Data are representative of three independent experiments as mean \pm SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$.

/NADH ratio를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Alloxan을 단독 처리한 HIT-T15 세포의 NAD⁺/NADH ratio는 3.17 ± 0.17 로 포도당이 들어있는 않는 대조군(5.69 ± 0.21)의 44.3% 정도 수준으로 유의적으로 감소한 반면, PME를 첨가한 세포는 NAD⁺/NADH ratio가 유의적으로 증가함을 확인하였다(PME100, 5.53 ± 0.69 ; PME250, 5.93 ± 0.38 ; PME500, 4.89 ± 0.63). Alloxan에 의해 발생된 활성산소종은 세포 내의 DNA strand break를 유발하고 이를 보수하기 위해 핵의 poly(ADP-ribose) synthetase 활성이 증가하므로 이 효소의 기질인 세포 내 NAD⁺가 고갈되면서 베타세포에 손상을 미친다(Okamoto, 1985; Park *et al.*, 1999). 본 실험에서도 alloxan 처리에 따른 NAD⁺/NADH ratio가 유의적으로 감소함을 확인하였다. 그러나 PME를 처리한 세포의 NAD⁺/NADH ratio가 유의적으로 증가한 것으로 보아 PME가 alloxan에 의한 활성산소종 생성을 효과적으로 억제함으로써 췌장베타세포의 손상을 억제하여 NAD⁺/NADH ratio가 증가한 것으로 보인다.

PME의 인슐린 분비능에 미치는 영향

PME가 alloxan으로 손상된 HIT-T15 세포의 인슐린 분

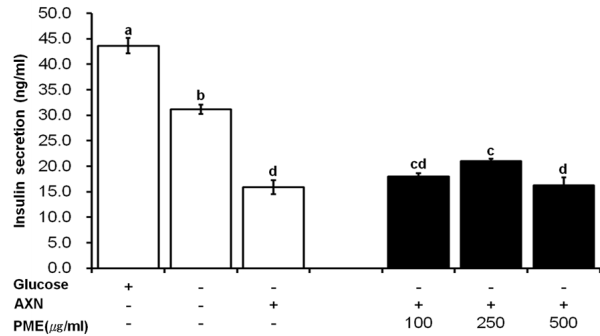


Fig. 5. Effect of the PME on insulin secretion of alloxan-treated HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then PME for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The insulin secretion was measured by Mouse Insulin kit as described in the Materials and methods section. Untreated and glucose-free controls are treated only 0.02% DMSO. Data are representative of three independent experiments as mean \pm SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$.

비능에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 5). 11 mM의 포도당이 들어있는 세포(43.6 ± 1.5 ng/ml)에 비해 포도당이 들어있지 않는 세포의 인슐린 분비능은 31.1 ± 1.0 ng/ml 및 alloxan 단독 처리 세포는 15.8 ± 1.3 ng/ml로 각각 유의적으로 감소함을 확인하였다. 그러나 250 μ g/ml의 PME를 alloxan과 함께 처리했을 때, alloxan 단독 처리 시 감소하였던 인슐린 분비가 21.9 ± 0.5 ng/ml로 유의적으로 촉진되었다. 다수 연구들을 통해 alloxan에 의한 췌장베타세포에 손상이 가해졌을 때, 세포생장이 억제됨과 동시에 인슐린 분비능도 감소하는 것으로 보고되고 있다(Lee *et al.*, 2008; Rho *et al.*, 2000). Alloxan에 의해 손상이 유도된 HIT-T15 세포의 인슐린 분비능은 예상대로 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, 250 μ g/ml의 PME를 처리한 세포에서 인슐린 분비능이 유의적으로 증가함에 따라, 적절한 농도의 PME가 산화스트레스로부터 세포를 보호하고 이에 따라 베타세포질량이 증가함에 따라 인슐린 분비가 증가되었다고 생각된다. 본 연구에서는 고농도의 PME를 처리한 세포에서 세포보호효과는 확인했음에도 불구하고 예상과는 다르게 인슐린 분비가 감소하는 결과가 나타났다. Jung *et al.*(2010)은 이러한 연구결과에 대하여 베타세포의 산화적 손상을 방어하기 위해 유효농도 이상으

로 항산화제를 처리하는 경우, 높은 삼투압과 활성산소종이 발생하여 인슐린 분비를 오히려 감소시킨다고 보고하였다. 이와 같은 점을 고려했을 때, PME가 alloxan으로 유발되는 활성산소종 생성을 억제하여 췌장베타세포의 사멸을 억제하고 췌장베타세포가 인슐린 분비능 개선을 보이는 유효농도는 250 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 추정된다.

Alloxan에 대한 PME의 HIT-T15 세포의 항산화효소 활성에 미치는 영향

PME의 췌장베타세포에 대한 항산화효소 활성을 측정하기 위하여 SOD, GST, GR 및 GPx 활성을 분석하였다(Table 1). Alloxan을 단독 처리한 HIT-T15 세포의 SOD 활성은 포도당이 들어있지 않는 세포에 비해 62.5% 유의적으로 감소한 반면, PME를 처리한 모든 세포의 SOD 활성이 alloxan 단독 처리군에 비해 2.3~3.3배 정도 유의적으로 증가하였다. 또한 HIT-T15 세포의 GPx 활성은 alloxan 단독 처리 시 포도당이 들어있지 않는 조건에 비해 67.8% 유의적으로 감소하였으나 PME 처리에 따라 3.6~5.7배 정도 유의적으로 증가하였다. Alloxan을 단독 처리한 세포의 GST와 GR 활성은 포도당이 들어있지 않는 세포에 비해 다소 감소하는 경향을 보였으나 PME의 처리농도가 증가할수록 유의적으로 GST와 GR 활성이 증가함을 확인하였다. SOD는 활성산소종 중 특히 superoxide anion radical(O_2^-)을 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 대표적인 항산화 효소 중 하나이며(Yun *et al.*, 2011), GPx는 GST와 함께 H_2O_2 를 제거하고 GSH를 산화형 GSH로 전환시키는 효소이다(Gao *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 1981; Montserrat

et al., 2009). 따라서 SOD와 GPx 활성은 산화적 손상에 대응하는 생물분자들의 일차 방어선으로 알려져 있다. GR은 산화형 GSH(GSSG)를 환원시켜 다시 GSH로 전환시키는 효소로 간접적으로 항산화 방어체계에 작용한다. Alloxan과 alloxan의 환원대사산물인 dialuric acid는 cycling reaction을 통해 O_2^- 과 H_2O_2 을 발생시켜 베타세포에 독성을 일으킨다(Cohen and Heikkila, 1974; Winterbourn *et al.*, 1989; Winterbourn and Munday, 1989). 즉, 이와 같은 자가촉매과정은 SOD에 의해 억제되며 발생된 H_2O_2 는 H_2O_2 를 불활성시키는 GPx 등의 작용에 의해 억제될 수 있다(Munday, 1988). Malaisse *et al.*(1982) 및 Ramkumar *et al.*(2009)은 alloxan에 의해 산화스트레스가 증가하여 췌장 베타세포의 항산화 효소인 GPx와 catalase의 활성이 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 alloxan에 의해 항산화 효소 활성의 감소가 확인되었다. 그러나 PME 처리는 alloxan에 노출된 HIT-T15 세포의 항산화효소 활성을 증가시키는 것으로 미루어 볼 때, PME는 alloxan에 의한 산화스트레스를 억제하는 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 췌장베타세포인 HIT-T15 세포를 이용하여 매실주정추출물(PME)의 alloxan에 의한 산화스트레스로부터 세포보호, 인슐린 분비능 및 항산화 효소 활성을 평가하였다. PME는 alloxan에 의해 유발된 산화스트레스로부터 세포를 보호하여 세포생존율을 증가시켰다. PME는 세포막 손상지표인 LDH 방출을 억제하였고 NAD^+/NADH

Table 1. Effect of the PME on antioxidant enzyme activities of HIT-T15 cells treated alloxan

Concentration of PME ($\mu\text{g/ml}$)	SOD (U/ μgP)	GPx (mU/ μgP)	GST (U/ μgP)	GR (U/ μgP)
Untreated	23.96 \pm 0.34 ^a	80.62 \pm 6.95 ^c	0.292 \pm 0.042 ^c	1.491 \pm 0.156 ^a
Glucose-free	20.35 \pm 0.47 ^b	58.00 \pm 0.57 ^d	0.195 \pm 0.011 ^d	0.637 \pm 0.015 ^{bc}
AXN	7.64 \pm 0.07 ^d	18.67 \pm 0.58 ^c	0.122 \pm 0.017 ^d	0.536 \pm 0.023 ^c
100	25.26 \pm 0.21 ^a	106.79 \pm 2.59 ^a	0.478 \pm 0.072 ^{bc}	0.901 \pm 0.095 ^{bc}
250	17.81 \pm 0.17 ^c	67.41 \pm 1.57 ^d	0.559 \pm 0.086 ^{ab}	0.941 \pm 0.076 ^b
500	18.83 \pm 0.52 ^c	94.07 \pm 3.03 ^b	0.702 \pm 0.051 ^a	1.611 \pm 0.158 ^a

HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then PME for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The antioxidant enzyme activities were measured by the commercial kits as described in the Materials and methods section. Untreated and glucose-free controls are treated only 0.02% DMSO. Data are representative of three independent experiments as mean \pm SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$.

ratio를 유의적으로 증가시켜 세포사멸이 억제되어짐을 확인하였다. 또한 alloxan 단독처리군에 비해 250 µg/ml PME 처리군에서 인슐린 분비량이 유의성 있게 증가하였다. Alloxan과 PME를 동시에 처리하여 HIT-T15세포의 항산화효소 활성을 측정했을 때 산화스트레스에 의해 감소되었던 항산화효소 활성이 PME에 의해 보호되는 효과를 확인하였다. 이상의 연구결과로부터 PME는 세포괴사 및 DNA fragmentation을 억제하고 세포내 항산화효소 활성을 증가시켜 alloxan에 의해 유발된 산화스트레스로부터 췌장베타세포를 보호하고 이에 따른 인슐린 분비능 조절 효과가 있는 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(PJ006706)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

인용문헌

- Butler, A.E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza and P.C. Butler. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110.
- Choi, D. and M. Woo. 2010. Executioners of apoptosis in pancreatic β -cells: not just for cell death. *American J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298:E735-741.
- Chung, Y.J., C.P. Park, Y.K. Jeong and Y.H. Choi. 2011. Apoptosis induction by methanol extract on *Prunus mume* fruits in human leukemia U937 cells. *J. Life. Sci.* 21: 1109-1119 (in Korean).
- Cohen, G. and R.E. Heikkila. 1974. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 249:2447-2452.
- De La Pea, V.A., P. Diz Dios and R. Tojo Sierra. 2007. Relationship between lactate dehydrogenase activity in saliva and oral health status. *Arch. Oral. Biol.* 52:911-915.
- Doh, E.S., J.P. Chang, K.J. Kil, M.S. Choi, J.K. Yang, C.W. Yun, S.M. Jeong, Y.H. Jung and G.H. Lee. 2011. Antioxidant activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Korean J. Plant Res.* 24:30-39 (in Korean).
- Donath M.Y., J.A. Ehses, K. Maedler, D.M. Schumann, H. Ellingsgaard, E. Eppler and M. Reinecke. 2005. Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* 54:S108-S113.
- Enomoto, S., K. Yanaoka, H. Utsunomiya, T. Niwa, K. Inada, H. Deguchi, K. Ueda, C. Mukoubayashi, I. Inoue, T. Maekita, K. Nakazawa, M. Iguchi, K. Arai, H. Tamai, N. Yoshimura, M. Fujishiro, M. Oka and M. Ichinose. 2010. Inhibitory effects of Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold et Zucc.; Ume) on Helicobacter pylori-related chronic gastritis. *European J. Clin. Nutr.*64:714-719.
- Gao, M., Y. Li and J. Yang. 2011. Protective effect of *Pedicularis decora* Franch root extracts on oxidative stress and hepatic injury in alloxan-induced diabetic mice. *J. Med. Plants Res.* 5:5848-5856.
- Han, J.T., Y.S. Lee, K.N. Kim and N.I. Baek. 2001. Rutin, Antioxidant Compound Isolated from the Fruit of *Prunus memu*. *J. Korean. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 44:35-37 (in Korean).
- Jones, D.P., L. Eklow and S. Orrenius. 1981. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 210:505-516.
- Jung H.K., Y.S. Jeong, C.D. Park, C.H. Park and J.H. Hong. 2010. Effect of the ethanol extract from citrus peels on oxidative damage in alloxan-induced HIT-T15 cell. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 39:1102-1106 (in Korean).
- Kim Y.S. 2008. Characteristics of diabetes in Korean population. *J. Korean Med. Assoc.* 51:799-805 (in Korean).
- Kim, S.G. and D.S. Choi. 2009. Epidemiology and current status of diabetes in Korea. *Hanyang Medical Reviews* 29:122-129 (in Korean).
- Lee, J.H., M.S. Na and M.Y. Lee. 2004. Effects of ethanol extract of *Prunus mume* on the antioxidative system and lipid peroxidation on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. *Korean J. Food. Preserv.* 11:71-78 (in Korean).
- Lee, J.H., J.W. Park, J.S. Kim, B.H. Park and H.W. Rho. 2008. Protective effect of *Amomi semen* extract on alloxan-induced pancreatic β -cell damage. *Phyther. Res.* 22:86-90.
- Lee, S.Y., U.Y. Kang, S.H. Park, S.K. Jung, K.W. Kang, T.C. Jeong, H.S. Kim, H.G. Jeong, B.H. Kim and S.K. Kim. 2009. Evaluation of hepatic antioxidant defense

- systems in rats treated with tetrabromobisphenol-A. J. Environ. Toxicol. 24:303-309 (in Korean).
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 51:216-226.
- Lupi, R. and S. Del-Prato. 2008. Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. Diabetes. Metab. 34:S56-64.
- Malaisse W.J., F. MALAISSE-Lagae, A. Sener and D.G. Pipeleers. 1982. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic β cell. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:927-930.
- Montserrat, M., A. Moreles, A. Colell, C. Garcia-Ruiz and J.C. Fernandez-Checa. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. ANTIOXID. REDOX. SIGN. 11:2685-2700.
- Moon, E.J., Y.E. Jo, T.C. Park, Y.K. Kim, S.H. Jung, H.J. Kim, D.J. Kim, Y.S. Chung and K.W. Lee. 2008. Clinical characteristics and direct medical costs of type 2 diabetic patients. Korean Diabetes. J. 32:358-365 (in Korean).
- Munday, R. 1988. Dialuric acid autoxidation-Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of 'active oxygen' species. Biochem. Pharmacol. 37:409-413.
- Okamoto, H. 1985. Molecular basis of experimental diabetes: Degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic β -cells of islet of Langerhans. Bioassay 2:15-21.
- Park, T.S., T.H. Lee and H.R. Kim. 1999. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced HIT-T15 cell damage. Korean Diabetes. J. 23:530-540 (in Korean).
- Park, I.B. and S.H. Baik. 2009. Epidemiologic characteristics of diabetes mellitus in Korea: Current status of diabetic patients using Korean Health Insurance Database. Korean Diabetes. J. 33:357-362 (in Korean).
- Park, Y.M., J.B. Jeong, J.H. Seo, J.H. Lim, H.J. Jeong and E.W. Seo. 2011. Inhibitory effect of red bean (*Phaseolus angularis*) hot water extracts on oxidative DNA and cell damage. Korean J. Plant Res. 24:130-138 (in Korean).
- Ramkumar K.M, C. Manjula, L. Sankar, S. Suriyanarayanan and P. Rajaguru. 2009. Potential in vitro antioxidant and protective effects of *Gymnema montanum* H. on alloxan-induced oxidative damage in pancreatic β -cells, HIT-T15. Food Chem. Toxicol. 47:2246-2256
- Rho, H.W., J.N. Lee, H.R. Kim, B.H. Park and J.W. Park. 2000. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced β -cell damage: Pivotal role of ATP. Exp. Mol. Med. 21:12-17.
- Seo, K.S., C.K. Huh and Y.D. Kim. 2008. Changes of biologically active components in *Prunus mume* fruit. Korean J. Food. Preserv. 15:269-273 (in Korean).
- Seneviratne C.J., R.W. Wong, U., Hgg, Y. Chen, T.D. Herath, P.L. Samaranyake and R. Kao. 2011. *Prunus mume* extract exhibits antimicrobial activity against pathogenic oral bacteria. Int. J. Paediatr. Dent. 21:299-305.
- Winterbourn, C.C. W.B. Cowden and H.C. Sutton. 1989. Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. Biochem. Pharmacol. 38:611-618.
- Winterbourn, C.C. and R. Munday. 1989. Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH. formation. Biochem. Pharmacol. 38:271-277.
- Yun, H.J., I. Kim, S.H. Kwon, J.S. Kang and A.S. Om. 2011. Protective effect of *Chlorella vulgaris* against lead-induced oxidative stress in rat brains. J. Health. Sci. 57:245-254.

(접수일 2012.1.25; 수정일 2012.3.13; 채택일 2012.3.28)