

## Alloxan에 의한 HIT-T15 세포 손상에 대한 쑥갓주정추출물의 세포보호효과

김인혜 · 조강진 · 고정숙 · 김재현 · \*엄애선\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, \*한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

### The Protective Effects of *Chrysanthemum cornarium* L. var. *spatiosum* Extract on HIT-T15 Pancreatic $\beta$ -Cells against Alloxan-induced Oxidative Stress

Inhye Kim, Kang-Jin Cho, Jeong-Sook Ko, Jae-Hyun Kim and \*Ae-Son Om\*

Functional Food & Nutrition Division, Dept. of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-853, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

#### Abstract

The objective of the present study was to evaluate the potential antidiabetic and antioxidant effect of the ethanol extract from *Chrysanthemum cornarium* L. var. *spatiosum*(CSE) against alloxan-induced oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cells, HIT-T15. In this study, the antidiabetic effect of CSE was examined using the 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) cell proliferation assay, lactate dehydrogenase(LDH) release assay,  $NAD^+$ /NADH ratio and insulin secretion. To further investigate whether CSE is involved in the antioxidant activity of alloxan-damaged HIT-T15 cells, its antioxidant effect against alloxan-induced oxidative stress was measured in HIT-T15 cells by determining the levels of 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, CSE significantly increased the viability of alloxan-treated cells and lowered LDH leakage. The intracellular  $NAD^+$ /NADH ratio and insulin secretion were also significantly increased by 1.7-fold and 1.3-fold, respectively, after treatment with 100  $\mu\text{g/ml}$  CSE. The HIT-T15 cells treated with alloxan showed significant decreases in the activities of antioxidant enzymes, while CSE significantly elevated the levels of antioxidant enzymes. These findings suggest that CSE could have a protective effect against cytotoxicity and dysfunction of pancreatic cells in the presence of alloxan-induced oxidative stress.

Key words: *Chrysanthemum cornarium* L. var. *spatiosum*, antidiabetes, antioxidant, alloxan, HIT-T15 cell

#### 서론

쑥갓(*Chrysanthemum cornarium* L. var. *spatiosum*)은 국화과(Compositae)에 속하며, 원산지가 지중해로 알려진 일년 내지 이년생 초본이다(Choi & Lee 2010). 우리나라를 비롯한 동아시아지역에서는 주로 채소로 이용하지만, 유럽에서는 꽃을

보기 위한 관상용으로 재배되는 식물이다. 쑥갓은 몸 속의 기운을 순환시켜 소화기관을 튼튼하게 하고, 위하수체나 위불쾌증을 완화시키는 약제로 우리나라에서 많이 상용되고 있는 채소 중 하나이지만, 현재까지 생리활성이나 기능성에 대해서는 그 연구가 매우 제한적으로 수행되었다. 최근 쑥갓의 생리활성으로 DPPH 라디칼 소거활성과 같은 항산화성이 우

\* Corresponding author: Ae-Son Om, Dept. of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea. Tel: +82-2-2220-1203, Fax: +82-2-2292-1226, E-mail: aesonom@hanyang.ac.kr

수하고, 항돌연변이능에 대한 보고가 있으며(Oh & Lee 2003), Cho 등(2007)은 썩갓 메탄올추출물의 아질산염 소거작용과 SOD 유사활성 작용에 대해서 보고하였다.

당뇨병은 유전적 요인과 환경적 요인으로 주로 면역학적 기전에 의해 췌장베타세포가 파괴되어 인슐린 분비가 일어나지 않는 제1형 당뇨병(인슐린 의존형)과 체내에서 인슐린이 생산되기는 하나, 말초에서 인슐린 저항성이 증가하는 제2형 당뇨병(인슐린비의존형)으로 분류한다(Brownlee 2005). 그러나 제2형 당뇨병에서도 혈당에 반응하는 인슐린 분비가 감소하고, 인슐린을 생산하는 베타세포질량( $\beta$ -cell mass)이 감소되는 특징을 보임에 따라 제2형 당뇨에서도 베타세포의 역할이 강조되고 있다(Kim 등 2008). 일반적으로 인슐린 저항성이 존재하더라도 이를 보상할 정도로 베타세포의 인슐린 분비능이 강화되고, 베타세포질량이 증가하는 경우, 정상 혈당이 유지된다. 그러나 유전적 또는 환경적 요인에 의해 당뇨병에 대한 감수성이 높은 사람들은 체내에서 필요한 만큼의 인슐린 공급이 원활하지 않아, 결국에는 당뇨병으로 발전하게 되는 것으로 알려져 있다(Choi & Woo 2010). 현재까지 우리나라에서 수행된 다수의 단면연구 및 추적연구를 통해 한국인 제2형 당뇨 발생과 악화에 영향을 미치는 주요 원인 중에 췌장베타세포 기능 저하에 따른 인슐린 분비능 저하가 예상되고 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 등 2003; Lupi & Del Prato 2008). 현재까지 베타세포의 자가사멸을 촉진하는 요인으로 여러 가지가 알려져 있으나, 그 중에서 대표적인 자극들이 고혈당에 의한 당독성, 지방산에 의한 지방독성 및 활성산소종들(Reactive oxygen species, ROS)의 증가에 의한 산화스트레스 등이다(Robertson 등 2004). 고농도의 포도당에 베타세포가 장시간 노출되는 경우, 베타세포의 자가사멸이 촉진되며, 인슐린 유전자 발현이 감소된다(Jung 등 2010). 또한 고농도의 포도당은 유리지방산과 함께 산화스트레스를 유발함으로써 발생된 활성산소종과 활성질소종(Reactive nitrogen species, RNS)에 의해 베타세포의 자가사멸을 더욱 유도시킨다(Donath 등 2005). 특히, 베타세포에 있어서 산화스트레스가 중요한 손상 요인으로 제기되고 있는 점은, 다른 세포들에 비해 항산화효소가 매우 적어 산화스트레스에 매우 취약한 것으로 보고되고 있기 때문이다(Kim 등 2008).

최근 우리나라의 경제성장은 식습관의 서구화를 비롯하여 생활양식의 급격한 변화를 초래하였으며, 이로 인해 암이나 비만 등과 같은 대사증후군의 발병율이 급증하고 있다(Park & Kim 2010). 특히 우리나라의 당뇨병 유병률은 1970년대 2%에 불과하였으나, 1990년대 초부터 10%에 육박하고 있다

(Park & Baik 2009). 지난 2003년 우리나라 당뇨병 환자는 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 & Choi 2009). 당뇨병은 심혈관계 합병증, 말초동맥 폐쇄질환, 당뇨병성 안질환 및 당뇨병성 신증과 같은 다양하고 심각한 합병증을 유발하여 삶의 질 저하와 사망하게 한다. 이로 인한 당뇨병자의 건강보험 진료비는 전체 총 진료비의 19.2%로 약 3조 1853억 원에 이르는 것으로 알려져 있다. 또한 직접비 외에도 합병증 등으로 발생하는 생산비 감소 등과 같은 간접비용까지 고려할 경우, 당뇨병으로 인한 사회경제적 비용은 급증할 것으로 추정된다(Moon 등 2008).

Alloxan은 환상요소 유도체(cyclic urea derivative)로 제1형 당뇨유발제로 실험 등의 목적으로 널리 사용되고 있다. 이 성분은 선택적으로 베타세포에 빠르게 축적되는 것으로 알려져 있으며, 베타세포의 포도당센서인 glucokinase를 억제하여 인슐린 분비를 감소시킨다. 이러한 작용과 더불어, ROS를 발생시켜 베타세포의 특징적인 세포괴사를 유발시켜 전체적으로 인슐린감소증(insulinopenia)을 보이는 당뇨를 초래한다(Lenzen S 2008).

따라서 본 연구에서는 제1형 당뇨병의 근본적인 원인인 췌장베타세포의 사멸을 유도하고, 최근 제2형 당뇨병에서 중요 역할을 하는 것으로 보고되고 있는 산화스트레스에 의한 췌장베타세포의 기능저하를 억제하는 식물자원을 탐색하고자 하였다. 이에 본 연구에서는 국내에서 상용 중인 농식품 중 하나인 썩갓주정추출물(*Chrysanthemum cornarium* L. var. *spatiosum*, CSE)을 대상으로 췌장베타세포의 세포보호, 손상 억제 및 인슐린 분비능을 검증함으로써 alloxan에 의해 발생된 산화스트레스로부터 췌장베타세포를 보호하여 당뇨병 조절에 도움이 되는 기능성 식품 소재 개발을 위한 가능성을 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 배지

본 실험의 세포배양에서 사용된 시약은 GIBCO사(Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 사용하였으며, 특별한 언급이 없는 시약은 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 최고 순도 등급 제품을 사용하였다.

### 2. 시료 추출 및 제조

썩갓은 2008년에 수확된 것으로 경기도 수원 시중에서 구입하였으며, 동결건조 후 분말화하였다. 10 g의 썩갓 분말 시료에 80% 주정 400 mL를 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 evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조하였다(Ilshin lab Co., Seoul, Korea). 동결건조한 추출물은 실험에 앞서 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 용해시킨 후 배지에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포배양에 처리된 DMSO의 최종농도는 0.02% 이하가 되도록 하였다. 제조된 쑥갓주정추출물(CSE)의 총 페놀화합물 함량과 총 당 함량을 각각 Folin-Denis 방법(Dewanto 등 2002)과 phenol sulfuric 방법(Duvlios 등 1956)으로 측정된 결과, 3.7±0.1 mg GAE/g과 235.8±4.2 mg/g으로 나타났다.

### 3. 세포배양

본 연구에서는 햄스터 췌장베타세포주인 HIT-T15 세포를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다(KTCC, Seoul, Korea). HIT-T15 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA) 및 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 첨가한 RPMI-1640(11.1 mM glucose 포함, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 약 70%의 세포 밀도(confluence)에 이르면 phosphate buffered saline(PBS, GIBCO BRL, Rockville, NY, USA)로 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA 용액(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)을 처리하여 계대 배양하였다.

### 4. MTT Assay

세포생존율은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay(SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 측정하였다. HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup>/well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 교환하였다. 각 군별로 시료를 농도 별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 각 well마다 5 mg/ml MTT를 20 μl씩 가한 후 4시간 동안 배양하였다. MTT가 들어있는 배지를 제거한 후 150 μl DMSO(SIGMA, St. Louis, MO, USA)를 가하고 30분간 배양하였다. 세포 내 formazan crystal을 용해시켜 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(VersaMax, Molecular Devices, USA).

### 5. Alloxan에 대한 세포 보호 효과

HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup>/well가 되도록 분주

하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 교환하였다. 여기에 각 well 당 1 mM alloxan(SIGMA, St. Louis, MO, USA)과 시료를 농도 별로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 세포생존율은 MTT colorimetric assay에 의해 측정하였다.

### 6. Lactate Dehydrogenase(LDH) Release Assay

HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup>/well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 교환하였다. 여기에 각 well 당 1 mM alloxan(SIGMA, St. Louis, MO, USA)과 시료를 농도 별로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고, 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지 GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 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.

### 7. NAD<sup>+</sup>/NADH 함량 측정

HIT-T15 세포를 24 well plate에 2×10<sup>5</sup>/well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 교환하였다. 각 well 당 1 mM alloxan(SIGMA, St. Louis, MO, USA)과 시료를 농도 별로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 cold-PBS로 세포를 세척한 후 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여(Micro 17R, Hanil, Incheon, Korea) 세포를 수거하였다. 세포 내 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio는 NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification kit(Biovision, Mountain View, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 8. 인슐린 분비능 측정

HIT-T15 세포를 24 well plate에 2×10<sup>5</sup>/well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Bio-

chemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 교환하였다. 여기에 각 well 당 1 mM alloxan(SIGMA, St. Louis, MO, USA)과 시료를 농도 별로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, cell culture supernatant를 수거하여 Mouse Insulin kit(Shibayagi, Shibukawa, Japan)으로 측정하였다.

### 9. 항산화효소 활성 측정

HIT-T15 세포를 24 well plate에  $2 \times 10^5$ /well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 교환하였다. 각 well 당 1 mM alloxan(Sigma, St. Louis, MO, USA)과 시료를 농도 별로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 free-glucose RPMI-1640 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 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  $\mu\text{g}$ 당 단백질로 계산하였으며, 단백질 정량은 Bradford에 의한 방법으로 Bio-Rad protein assay 시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)을 이용하여 측정하였다.

### 10. 통계처리

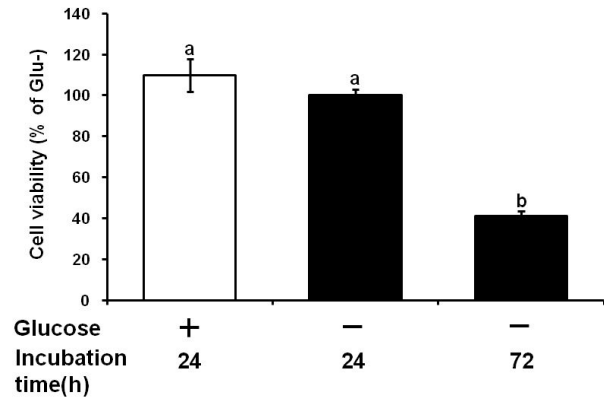
모든 실험 결과는 평균(mean) $\pm$ 표준오차(standard error, SE)로 표시하였다. 각 군 간의 통계적 유의성 검증은 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였고,  $p < 0.05$  유의수준에서 사후 검정으로 Duncan's multiple range test(DMRT)로 분석하였다. 모든 통계분석은 SPSS version 12.0 통계 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였다.

## 결과 및 고찰

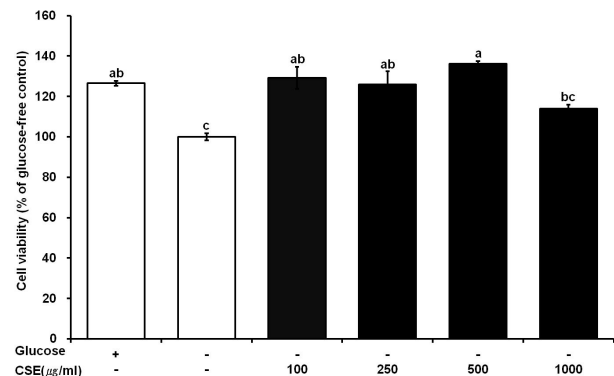
### 1. CSE 처리 농도에 따른 HIT-T15 세포생장률

본 연구에서는 배지 자체에 함유되어 있는 포도당의 영향을 최소화하고자 포도당이 미포함된 배지를 사용했을 때, HIT-T15 세포의 생장률이 저해되지 않는 최적 배양시간을 측정하였다(Fig. 1). HIT-T15 세포의 생장률은 24시간 동안 배

양 시에는 배지의 포도당 함유 유/무에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 포도당이 함유되어 있지 않는 배지에서 72시간 세포 배양 시, 생장률이 유의적으로 감소함에 따라 추후 실험은 포도당 미포함 배지에서 24시간 동안 배양하여



**Fig. 1. Effect of incubation period on cell viability of HIT-T15 cells with or without glucose.** HIT-T15 cells were cultured with or without glucose medium for 24 hrs to 72 hrs. The cell viability was assessed by MTT assay. The cell density was measured at 540 nm wavelength by the microplate reader. 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  $p < 0.05$ .

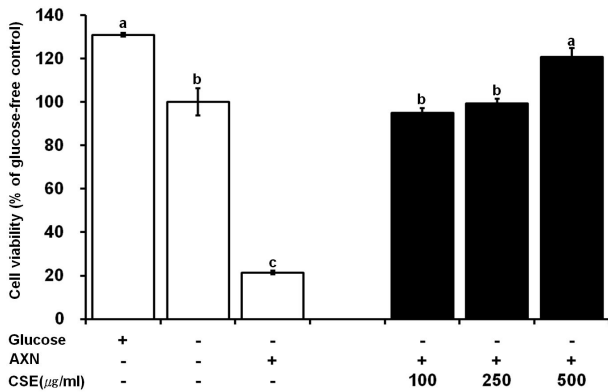


**Fig. 2. Effect of the CSE on cell viability of HIT-T15 cells.** HIT-T15 cells were treated with CSE for 24 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The cell viability treated with CSE was assessed by MTT assay. The cell density was measured at 540 nm wavelength by the microplate reader. Untreated 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  $p < 0.05$ .

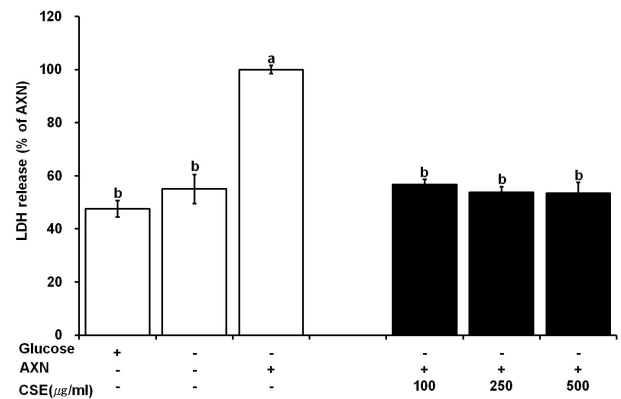
CSE의 효과를 알아보기 위하여 CSE의 처리농도에 따라 HIT-T15 세포의 증식에 영향을 미치는 범위를 알아보기 위해 100~1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 세포 성장률을 조사하였으며 대조군에 대한 %비율로 표시하였다(Fig. 2). 11 mM의 포도당이 들어있는 처리군에 비해 포도당이 들어있는 않는 대조군의 세포생장은 약 21.9%가 유의적으로 감소하였다. 그러나 100~500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 CSE를 처리했을 때, 세포생장이 포도당이 들어있는 않는 대조군에 비해 25.9~36.1%가 유의적으로 증가하여 11 mM의 포도당이 들어있는 처리군과 통계상 유사한 수준이었다.

## 2. Alloxan에 대한 CSE의 HIT-T15 세포보호효과

췌장베타세포를 선택적으로 손상시켜 세포 파괴를 유도하는 alloxan을 시료인 CSE와 동시 처리하여 CSE에 의한 HIT-T15 세포보호효과를 MTT assay로 확인하였다(Fig. 3). 포도당이 들어있지 않은 대조군에 비해 11 mM 포도당 함유 처리군은 세포생존이 31% 정도 유의적으로 증가하였으나, alloxan 처리에 따라 세포생존이 78.6% 정도 유의적으로 감소하였다. 그러나 CSE를 alloxan과 동시 처리했을 때, alloxan 단독 처리군에 비해 세포생존율이 약 4.5~5.7배 정도 유의적으로 증가하여 CSE 처리가 alloxan의 손상으로 부터 세포를 보호하여 생존율을 높이는 것으로 생각된다.



**Fig. 3. Effect of the CSE on cell viability of alloxan-treated HIT-T15 cells.** HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then CSE for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The cell viability treated with CSE 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  $p < 0.05$ .



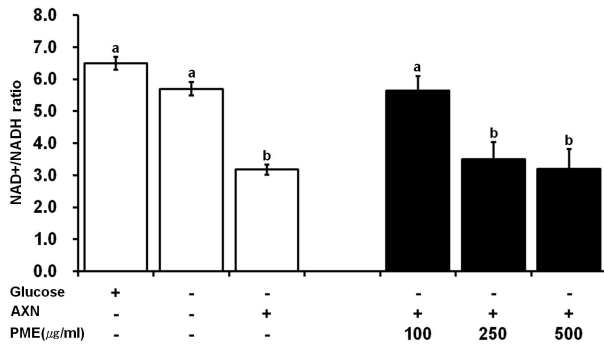
**Fig. 4. Effect of the CSE on LDH release of alloxan-treated HIT-T15 cells.** HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then CSE for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The LDH release was measured by LDH cytotoxicity kit as described in the Materials and Methods 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  $p < 0.05$ .

## 3. CSE 처리가 HIT-T15 세포의 LDH 방출에 미치는 영향

Alloxan에 의한 세포손상에 대해 CSE 처리가 세포사멸을 억제하는지 알아보기 위하여 LDH 방출량을 측정하였다(Fig. 4). 포도당이 들어있는 않는 대조군에 비해 alloxan을 단독 처리했을 때, HIT-T15 세포에서 LDH 방출량이 42.8% 정도 유의적으로 증가하였다. 그러나 alloxan과 함께 CSE를 처리한 결과, 모든 농도군에서 LDH 방출량이 alloxan 단독 처리군에 비해 유의적으로 감소하였다. 따라서 alloxan의 독성에 의한 세포막 손상으로 방출되는 LDH가 CSE 처리에 의해 감소하고 있음을 확인함을 통해 CSE가 alloxan으로 유발된 췌장베타세포 손상을 강력하게 억제함으로써 방출되는 LDH 함량을 효율적으로 감소시키는 것으로 생각된다. 세포가 손상을 받으면 세포막 파열로 인해 LDH 방출이 증가하며, 이 때 발생하는 세포사멸은 주로 세포괴사(necrosis)에 따른 것으로 보고되고 있다(De La Peña 등 2007). Chen 등(2010)의 연구에서도 췌장세포주에 산화스트레스를 일으키는 염화수은을 처리했을 때 손상된 세포의 세포질로부터 방출되는 LDH가 유의적으로 증가하였고, 항산화제를 처리할 때 LDH 방출량이 억제된다고 보고하였다.

## 4. HIT-T15 세포 내 NAD<sup>+</sup>/NADH Ratio 측정

Alloxan과 함께 CSE를 처리하여 HIT-T15 세포의 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. Alloxan을 단독

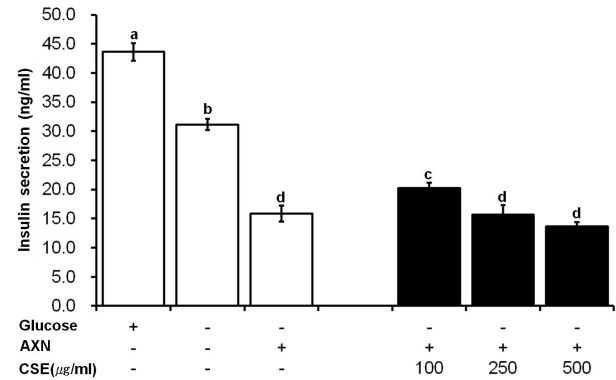


**Fig. 5.** Effect of the CSE on NAD<sup>+</sup>/NADH ratio of alloxan-treated HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then CSE for 23 hrs under the glucose-free RPMI-1640 medium. The NAD<sup>+</sup>/NADH ratio was measured by NAD<sup>+</sup>/NADH quantification 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 ± SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p < 0.05$ .

처리한 HIT-T15 세포의 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio는 3.17±0.17로 포도당이 들어있는 않는 대조군(5.69±0.21)의 44.3% 정도 수준으로 유의적으로 감소하였다. 100 µg/ml의 CSE를 처리한 실험군에서는 alloxan 단독 처리군에 비해 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio가 유의적으로 증가하였다. Alloxan 등에 의해 발생된 산화스트레스는 체내에서 활성산소종을 생성시키며, 이와 같은 활성산소종은 세포 내의 DNA strand break를 유발하고, 이를 보수하기 위해 핵의 poly(ADP-ribose) synthetase 활성이 증가한다 (Okamoto 1985). 세포 내의 NAD<sup>+</sup>는 이 효소의 기질로 효소 활성이 증가함에 따라 NAD<sup>+</sup>가 고갈되어 베타세포의 손상을 미친다(Park 등 1999). 본 연구결과와 유사하게 Kim 등(2010)의 연구에서도 돼지갑자추출물 첨가가 췌장베타세포의 생존률과 함께 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio가 증가되었다고 보고하였다. 그러나 250 µg/ml 이상의 고농도 CSE 처리군에서의 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio가 alloxan 단독 처리군과 유의적인 차이를 보이지 않음에 따라, 고농도의 CSE 처리는 alloxan에 의해 생성된 ROS에 대한 보호 효과보다는 오히려 베타세포의 손상을 유발시킬 가능성도 있음을 따라 처리 농도가 중요할 것으로 생각된다.

##### 5. CSE의 인슐린 분비능에 미치는 영향

CSE 첨가에 의해 산화스트레스 손상이 보호된 HIT-T15 세포의 인슐린 분비능을 분석하였다(Fig. 6). 11 mM의 포도당



**Fig. 6.** Effect of the CSE on insulin secretion of alloxan-treated HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were treated with alloxan (AXN, 1 mM) for 1 hrs and then CSE 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±SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p < 0.05$ .

이 들어있는 처리군의 인슐린 분비능에 비해 포도당이 들어 있지 않는 대조군은 28.9% 및 alloxan 단독 처리군은 63.8%가 각각 유의적으로 감소하였다. 그러나 100 µg/ml의 CSE 처리군에서는 alloxan 단독 처리군에 비해 인슐린 분비능이 유의적으로 26.5%가 증가하였다. 다수 연구들을 통해 alloxan에 의한 췌장베타세포에 손상이 가해졌을 때, 세포생장이 억제됨과 동시에 인슐린 분비능도 감소하는 것으로 보고되고 있다(Rho 등 2000; Lee 등 2008). 그러나 Jung 등(2010)은 진피에 탄올추출물 처리에 의해 alloxan으로 손상이 유발된 HIT-T15 세포의 생존률을 보호할 뿐 아니라 베타세포질량 증가로 인한 인슐린 분비가 증가할 수 있음을 보여주었다. 또한 250 µg/ml 이상의 고농도 CSE 처리는 오히려 HIT-T15 세포의 인슐린 분비를 감소시켰으며, 이러한 결과는 고농도의 CSE 처리 시 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio가 감소하는 결과와 연관된 것으로 생각된다. 고농도의 포도당에 췌장베타세포가 장기간 노출되는 경우, ROS 생성이 오히려 증가되어 인슐린 분비능을 감소시킨다고 보고된다(Yoon 등 2006). 또한 고농도의 당 상태에서 유효농도 이상의 항산화제 처리 시, 높은 삼투압과 과다한 ROS 생성이 발생하여 인슐린 분비가 감소된다(Xiang 등 2007). 따라서 본 실험에서는 CSE의 효과적인 인슐린 분비능 처리 농도는 100 µg/ml 정도일 것으로 추정되며, 이는 본 시료의 당 함량과 관계가 있을 것으로 예상된다. 100 µg/ml CSE 처리는 alloxan으로부터 HIT-T15 세포를 보호함으로써 세포

사멸을 억제함과 동시에 인슐린 분비능 손상을 억제시키는 것을 확인하였다.

#### 6. Alloxan에 대한 CSE의 HIT-T15 세포의 항산화효소 활성에 미치는 영향

CSE의 췌장베타세포에 대한 항산화효소 활성을 측정하기 위하여 SOD, GST, GR 및 GPx 활성을 분석하였다(Table 1). Alloxan과 alloxan의 환원대사산물인 dialuric acid는 cycling reaction을 통해  $O_2^{\cdot -}$ 과  $H_2O_2$ 을 발생시켜 베타세포에 독성을 발생시키며(Cohen & Heikkila 1974), 이와 같은 자가촉매과정은 SOD에 의해 억제되고, 발생된  $H_2O_2$ 는 GPx 등의 작용에 의해 불활성화되어 무독화된다(Munday 1988). SOD는 활성산소종의 하나인 superoxide anion radical( $O_2^{\cdot -}$ )을 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환시키는 대표적인 항산화 효소 중 하나이다(Yun 등 2011). 또한 GPx는 GST와 함께 SOD에 의해 전환된  $H_2O_2$ 를 제거하고, GSH를 산화형 GSH로 전환시키는 효소이다(Jones 등 1981; Gao 등 2011). 따라서 SOD와 GPx 활성은 산화적 손상에 대응하는 생물분자들의 일차 방어선으로 알려져 있다. 그리고 GR은 산화형 GSH(GSSG)를 환원시켜 다시 GSH로 전환시키는 효소로 간접적으로 항산화 방어체계에 작용한다. Alloxan을 단독 처리한 HIT-T15 세포의 SOD 활성은 포도당이 들어있지 않는 세포에 비해 62.5% 유의적으로 감소한 반면, 100 및 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CSE를 처리한 세포의 SOD 활성이 alloxan 단독 처리군에 비해 각각 2.6 및 5.2배 정도 유의적으로 증가하였다. Alloxan을 단독 처리한 세포의 GST와 GR 활성은 포도당이 들어있지 않는 세포에 비해 다소 감소하는 경향을 보였으나, CSE의 처리농도가 증가할수록 유의적으로 GST와 GR 활성이 증가함을 확인하였다. 또한 HIT-T15 세포의 GPx 활성은 alloxan 단독 처리 시 포도당이 들어있지 않는 조건에 비해 67.8% 유의적으로 감소하였으나, CSE 처리에 따

라 2.2~3.9배 정도 유의적으로 증가하였다. Malaisse 등(1982) 및 Ramkumar 등(2009)은 alloxan에 의해 산화스트레스가 증가하여 췌장베타세포의 항산화 효소인 GPx와 catalase의 활성이 감소하였다고 보고하였다. 또한 Jung 등(2010)은 미강 폐놀산 농축물의 항산화성으로 인해 HIT-T15 세포의 활성산소종이 유의적으로 감소시켜 췌장 세포의 자유라디칼에 의한 손상 보호 효과를 보고하였다. 본 연구에서도 alloxan에 의해 항산화효소 활성의 감소가 관찰되었으나, CSE 처리에 의해 alloxan에 노출된 HIT-T15 세포의 항산화효소 활성이 증가함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 CSE가 HIT-T15 세포의 항산화효소 활성을 증가시킴으로써 alloxan에 의한 산화스트레스 손상에 대응하여 세포를 보호하는 것으로 생각된다.

#### 요약 및 결론

본 연구는 췌장베타세포인 HIT-T15 세포를 이용하여 췌장 주정추출물(CSE)의 alloxan에 의한 산화스트레스로부터의 세포보호, 인슐린 분비능 및 항산화 효소 활성을 평가하였다. CSE는 alloxan에 의해 유발된 산화스트레스로부터 세포를 보호하여 세포생존율을 증가시켰다. CSE는 세포막 손상지표인 LDH 방출을 감소시켰고  $NAD^+/NADH$  ratio를 유의적으로 증가시켜 세포사멸을 억제하였다. 또한 alloxan 단독처리군에 비해 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CSE 처리농도에서 인슐린 분비량이 유의적으로 증가하였다. CSE 처리는 HIT-T15 세포 내 항산화효소 활성을 유의적으로 상승시켰다. 이상의 연구결과로부터 CSE는 alloxan에 의해 유발된 산화스트레스로부터 췌장베타세포의 항산화 효소 활성을 증가시킴으로써 세포괴사 및 DNA fragmentation을 억제하여 세포사멸을 억제하고 생존률을 증가시키고, 이에 따라 인슐린 분비능 조절에도 영향을 미치는 것으로 생각된다.

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

Concentration of CSE ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	SOD (U/ $\mu\text{gP}$ )	GST (U/ $\mu\text{gP}$ )	GR (U/ $\mu\text{gP}$ )	GPx (mU/ $\mu\text{gP}$ )
Untreated	23.96±0.34 <sup>b</sup>	0.292±0.042 <sup>c</sup>	1.491±0.156 <sup>b</sup>	80.62±6.95 <sup>a</sup>
Glucose-free	20.35±0.47 <sup>b</sup>	0.195±0.011 <sup>d</sup>	0.637±0.015 <sup>d</sup>	58.00±0.57 <sup>b</sup>
AXN	7.64±0.07 <sup>c</sup>	0.122±0.017 <sup>d</sup>	0.536±0.023 <sup>d</sup>	18.67±0.58 <sup>d</sup>
100	20.19±0.25 <sup>b</sup>	2.110±0.091 <sup>b</sup>	0.891±0.055 <sup>cd</sup>	72.08±7.00 <sup>a</sup>
250	39.51±1.77 <sup>a</sup>	3.655±0.079 <sup>ab</sup>	2.262±0.074 <sup>a</sup>	55.51±2.50 <sup>b</sup>
500	11.07±0.77 <sup>c</sup>	5.295±0.019 <sup>a</sup>	1.374±0.098 <sup>bc</sup>	40.57±2.57 <sup>c</sup>

HIT-T15 cells were treated with alloxan(AXN, 1 mM) for 1 hrs and then CSE 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±SE. Statistical evaluation was done by ANOVA followed by DMRT. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p<0.05$ .

## 감사의 글

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

## 참고문헌

- Brownlee M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110
- Chen YW, Huang CF, Yang CY, Yen CC, Tsai KS, Liu SH. 2010. Inorganic mercury causes pancreatic  $\beta$ -cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 243:323-331
- Cho MJ, Park M, Lee HS. 2007. Nitrite scavenging ability and SOD-like activity of a sterol glucoside from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*. *Korean J Food Sci Technol* 39:77-82
- Choi D, Woo M. 2010. Executioners of apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells: not just for cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E735-741
- Choi EJ, Lee SM. 2010. Quality characteristics of Sulgidduk with added Ssukgat(*Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*) powder. *J East Asian Soc Dietary Life* 20:509-515
- Cohen G, Heikkila RE. 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 Peña VA, Diz Dios P, Tojo Sierra R. 2007. Relationship between lactate dehydrogenase activity in saliva and oral health status. *Arch Oral Biol* 52:911-915
- Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:4595-4964
- Donath MY, Eshes JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M. 2005. Mechanisms of  $\beta$ -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* 54:S108-S113
- Duvlios M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Gao M, Li Y, Yang J. 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
- Jones DP, Eklow L, Orrenius S. 1981. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: Relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated  $H_2O_2$ . *Arch Biochem Biophys* 210:505-516
- Jung EH, Ha TY, Hwang IK. 2010. Anti-hyperglycemic and antioxidant activities of phenolic acid concentrates of rice bran and hydroxycinnamic acids in cell assays. *Korean J Food & Nutr* 23:233-239
- Jung HK, Jeong YS, Park CD, Park CH, Hong JH. 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
- Kim JL, Bae CR, Cha YS. 2010. *Helianthus tuberosus* extract has anti-diabetes effects in HIT-T15 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:31-35
- Kim MK, Jung HS, Yoon CS, Kwon MJ, Koh KS, Rhee BD, Park JH. 2008. The protective effect of EGCG on INS-1 cell in the oxidative stress and mechanism. *Korean Diabetes J* 32:121-130
- Kim SG, Choi DS. 2009. Epidemiology and current status of diabetes in Korea. *Hanyang Med Rev* 29:122-129
- Kim YS. 2008. Characteristics of diabetes in Korean population. *J Korean Med Assoc* 51:799-805
- Lee JH, Park JW, Kim JS, Park BH, Rho HW. 2008. Protective effect of *Amomi semen* extract on alloxan-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage. *Phytother Res* 22:86-90
- Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226
- Lupi R, Del-Prato S. 2008. Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: Quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab* 34:S56-64
- Malaisse WJ, Malisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers DG. 1982. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic  $\beta$  cell. *Proc Natl Acad Sci* 79:927-930
- Moon EJ, Jo YE, Park TC, Kim YK, Jung SH, Kim HJ, Kim DJ, Chung YS, Lee KW. 2008. Clinical characteristics and direct medical costs of type 2 diabetic patients. *Korean Diabetes J* 32:358-365
- 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



- Oh SI, Lee MS. 2003. Screening for antioxidative and antimutagenic capacities in 7 common vegetables taken by Korean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:1344-1350
- Okamoto H. 1985. Molecular basis of experimental diabetes: Degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells of islets of Langerhans. *Bioassay* 2:15-21
- Park IB, Baik SH. 2009. Epidemiologic characteristics of diabetes mellitus in Korea: Current status of diabetic patients using Korean Health Insurance Database. *Korean Diabetes J* 33: 357-362
- Park SH, Kim GY. 2010. Blood glucose level, insulin content and biochemical variables of complex extract from oriental medicinal plants on diabetes rats. *Korean J Food & Nutr* 23:258-268
- Park TS, Lee TH, Kim HR. 1999. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced HIT-T15 cell damage. *Korean Diabetes J* 23:530-540
- Ramkumar KM, Manjula C, Sankar L, Suriyanarayanan S, Rajaguru P. 2009. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Gymnema montanum* H. on alloxan-induced oxidative damage in pancreatic  $\beta$ -cells, HIT-T15. *Food Chem Toxicol* 47:2246-2256
- Rho HW, Lee JN, Kim HR, Park BH, Park JW. 2000. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced  $\beta$ -cell damage: Pivotal role of ATP. *Exp Mol Med* 32:12-17
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. 2004. Beta cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53:S119-124
- Xiang L, Huang X, Chen L, Rao P, Ke L. 2007. The reparative effects of *Momordica charantia* Linn. extract on HIT-T15 pancreatic beta-cells. *Asia Pac J Clin Nutr* 16:249-252
- Yoon JS, Won KC, Lee HW. 2006. Glucose oxidation and production of reactive oxygen species(ROS) in INS-1 cells and rat islet cells exposed to high glucose. *J Kor Diabetes Assoc* 30:246-253
- Yun HJ, Kim I, Kwon SH, Kang JS, Om AS. 2011. Protective effect of *Chlorella vulgaris* against lead-induced oxidative stress in rat brains. *J Health Sci* 57:245-254

---

접 수 : 2012년 1월 25일  
 최종수정 : 2012년 3월 20일  
 채 택 : 2012년 3월 20일