Journal of Nutrition and Health (J Nutr Health) 2014; 47(3): 167 ~ 175
http://dx.doi.org/10.4163/jnh.2014.47.3.167
pISSN 2288-3886 / eISSN 2288-3959

Research Article

청미래덩굴 잎 물추출물이 처리된 HepG2 세포에서의 포도당흡수기전 연구*

강윤환[1] · 김대중[1] · 김경곤[2] · 이성미[2] · 최 면[1,2†]
강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터,[1] 강원대학교 생명건강공학과[2]

Study of the mechanisms underlying increased glucose absorption in *Smilax china* L. leaf extract-treated HepG2 cells*

Kang, Yun Hwan[1] · Kim, Dae Jung[1] · Kim, Kyoung Kon[2] · Lee, Sung Mee[2] · Choe, Myeon[1,2†]
[1]Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[2]Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

Purpose: Previous studies have shown that treatment with *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) produces antidiabetic effects due to α-glucosidase inhibition. In this study, we examined the mechanism underlying these antidiabetic effects by examining glucose uptake in HepG2 cells cultured with SCLE. **Methods:** Glucose uptake and glucokinase activity were examined using an assay kit. Expression of glucose transporter (GLUT)-2, GLUT-4, and HNF-1α was measured by RT-PCR or western blot. **Results:** Treatment with SCLE resulted in enhanced glucose uptake in HepG2 cells, and this effect was especially pronounced when cells were cultured in an insulin-free medium. SCLE induced an increase in expression of GLUT-2 but not GLUT-4. The increase in the levels of HNF-1α, a GLUT-2 transcription factor, in total protein extract and nuclear fraction suggest that the effects of SCLE may occur at the level of GLUT-2 transcription. In addition, by measuring the change in glucokinase activity following SCLE treatment, we confirmed that SCLE stimulates glucose utilization by direct activation of this enzyme. **Conclusion:** These results demonstrate that the potential antidiabetic activity of SCLE is due at least in part to stimulation of glucose uptake and an increase in glucokinase activity, and that SCLE-stimulated glucose uptake is mediated through enhancement of GLUT-2 expression by inducing expression of its transcription factor, HNF-1α.

KEY WORDS: *Smilax china*. L, anti-diabetic activity, glucose uptake, glucose transporter, glucokinase.

서 론

청미래덩굴 (*Smilax china* L.)은 한국, 일본, 중국 등의 국가에서 널리 분포하는 백합과 (Liliaceae)의 덩굴성 갈잎떨기나무로 명감나무, 망개나무라고도 불린다. 5월에 황록색의 꽃이 피며 열매는 둥근 장과로 9~10월에 적색으로 익는다.[1] 뿌리줄기는 토복령 (土茯苓)이라고 하며 동의치료에서 습을 내보내며 열내림과 피를 맑게 하고 오줌내기, 독풀이 효과가 있다 하여 매독, 창독, 만성피부병 및 수은 중독에 사용되었다.[2] 청미래덩굴 잎은 항균작용이 있어 민간에서는 망개떡 등에 사용되고 있다. 이들의 성분으로는 kaempferol-7-O-α-L-rhamnopyranoside과 kaempferol-3,7-O-α-L- dirhamnopyranoside 같은 flavonoid 계열 물질이 보고되었으며 항산화 활성과 함께 α-glucosidase inhibition 효과가 최근 본 연구그룹에 의해 보고되었다.[3,4] 그 외 청미래덩굴 뿌리를 이용한 혈당강하에 의한 항당뇨 효과가 Bhati 등[5]에 의해 보고된 바는 있으나 청미래덩굴 잎을 이용한 항당뇨 효능에 대한 구체적인 연구결과는 거의 알려지지 않았다.

당뇨병은 삶의 질을 떨어뜨리는 1위 질환으로서 전세계인구

Received: Feb 26, 2014 / Revised: Mar 18, 2014 / Accepted: Apr 22, 2014
*This work was supported by grants of Well-being Bioproducts Regional Innovation Center project (B0009702) and 2013 Research Grant from Kangwon National University.
†To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-33-250-8645, e-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

© 2014 The Korean Nutrition Society
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 3%가 당뇨병으로 고통 받고 있으며, 국내에서도 2011년 당뇨병 및 당뇨합병증으로 인한 사망률이 전체 사망원인의 다섯 번째를 차지하는 것으로 보고되고 있다.[6] 최근 식생활의 서구화로 인한 비만인구의 증가로 당뇨병 유병률이 약 10%를 차지하고 있으며 매년 증가하는 추세이다.[6] 당뇨병은 유전이나 대사적 요인 등에 의하여 췌장 β-cell에서의 인슐린 분비장애와 조직에서의 인슐린 저항성 등으로 발병되며 고혈당이 주요 증상이다.[7,8] 당뇨에 의한 고혈당을 해결하기위한 많은 연구접근방법 중 최근에는 섭취한 음식으로부터 당류의 생성을 억제하는 방법[9]과 생성된 당을 세포 내로 빠르게 전달시키는 방법[10]이 시도되고 있다. 이런 포도당의 이동은 세포 내에 존재하는 다양한 glucose transporter (GLUT)들을 통해 이루어지는 것이 잘 알려져 있다.

한편, 음식으로부터 섭취된 포도당은 주로 간, 근육 및 지방조직에서 소모되는데, 그중 간은 포도당의 소모뿐만 아니라 저장에 주로 작용하며 공복 시 신체가 필요로 하는 대부분의 포도당을 공급하는 중요한 기관이다.[11,12] 자세히 설명하면, 음식 섭취 후 약 2시간이 지나면 혈당이 상승하고 섭취한 포도당의 10~25%는 간세포에 의해 흡수된다.[13] 이런 일련의 간세포에 의한 포도당흡수는 GLUTs에 의해 매개되며, 그 중 GLUT-2는 간세포에 가장 많이 분포할 뿐만 아니라 정상수준 이상의 포도당농도에 노출되면 빠르게 많은 양의 포도당을 세포내로 흡수하여 세포내외의 빠른 포도당균형을 유도할 수 있게 한다.[14] 이런 GLUT-2의 발현이 hepatitis C virus (HCV)에 장기간 감염될 경우 감소하게 되며 그로인해 당뇨병이 유발할 수 있음이 보고되어 있다.[15] 그러므로 GLUT-2의 발현유도는 효과적으로 혈당상승을 억제하고 HCV에 의한 당뇨유발을 억제하는 효과를 이끌어 낼 수 있을 것이다. 또한 GLUT-2는 소장을 통해 혈관으로 포도당이 이동하는 것을 돕고 간에서 생성된 포도당을 혈관으로 이동시키는 역할을 하여 체내 포도당의 항상성을 유지시킬 뿐만 아니라 췌장 β-cell에서 포도당 sensing을 통해 인슐린 분비를 유도하는 것으로 알려져 있어,[16-18] GLUT-2의 발현조절이 체내 포도당 대사에 중요함을 알 수 있다. GLUT-2의 발현을 조절하는 transcription factor로 hepatocyte nuclear factors (HNF)-1α, HNF-4α, forkhead box A2 (FOXA2), sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c, CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP)β 등이 알려져 있으며[19] 그 중 human GLUT-2 promoter에 결합하는 transcription factor로는 HNF-1α[20]와 C/EBPβ[21]가 보고되어있으며 최근 human GLUT-2의 promoter에 관한 다양한 연구가 지속되고 있다. GLUTs에 의해 세포내로 이동한 포도당은 먼저 glucokinase (GK)에 의해 glucose-6-phosphate (G6P)로 전환되는데 이렇게 전환된 포도당은 에너지 대사 또는 지방합성기전의 원료가 된다.[13] 최근의 연구에 의하면 포도당 대사의 첫 번째 효소인 GK의 활성을 증가시켜 혈당을 강하시키는 시도가 진행되고 있다.[22,23] 이런 이유로 최근 천연물을 이용한 glycolysis관련 효소들의 발현유도 등에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다.[24,25]

이에 본 연구에서는 청미래덩굴 잎 물 추출물을 이용하여 HepG2세포에서의 GLUTs를 통한 포도당흡수 기전 연구 및 *in vitro* GK 활성 측정을 통해 포도당 대사에 미치는 영향을 평가하고 그 활용가능성을 제시하고자한다.

연구방법

시 료

실험에 이용된 청미래덩굴 잎은 경상남도 의령지역에서 채집하여 신흥묵교수 (동국대학교 한의과대학)에 의해 검수된 것을 사용하였으며, 건조 후 각각 마쇄한 뒤 무게 당 10배의 증류수를 가하여 60℃에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출하고 filter paper로 여과한 다음 감압 농축 후 동결건조 한 것을 시료로 사용하였다.

세포주 배양 및 세포독성 시험

HepG2 세포 (hepatocellular carcinoma)는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. HepG2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin (PEST, Welgene)이 첨가된 Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies, CA, USA) 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 필요에 따라 DMEM 배지의 포도당 농도는 1 mM, 5 mM, 25 mM로 각각 사용하였다.

세포독성은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) assay를 통해 확인하였다. HepG2 cell을 96-well tissue culture plate에 1×10^4 cells/well로 100 μl씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 배지에 SCLE를 농도별로 제조한 후 세포에 처리한 후 24시간 동안 37℃에서 배양 하였다. 24시간 후 배양중인 배지에 CCK-8 reagent를 10 μl씩 가해주고 3시간 동안 37℃에서 배양한 후 ELISA microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (control)의 흡광도 값을 기준으로 세포독성을 비교하였다.

Glucose uptake

청미래덩굴 잎 물 추출물 (SCLE)의 처리에 따른 HepG2 세포의 glucose uptake 변화는 glucose uptake colorimetric assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)을 이용하여 수행하였다.

즉, HepG2 세포를 96-well plates에 1 × 10^5 cells/ml로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 배양된 세포는 2% BSA가 포함되어 있는 KRPH (Krebs ringer phosphate HEPES)로 교체하였다. 40분 후, 1 μM의 인슐린과 SCLE (0.25 mg/ml)를 처리하여 20 분간 동안 더 배양한 다음 10 mM 2-deoxyglucose를 20분간 처리하였다. 세포에 Assay buffer 8 μl와 enzyme mix A 2 μl를 처리한 후 37℃에서 1시간 동안 반응한 후 extraction buffer를 이용해 세포추출물을 회수하였다. 85℃에서 40분간 가열한 후 차갑게 식혔으며 neutralization buffer를 첨가하였다. 500 rpm에서 10초간 원심분리하고 상층액을 취하였으며, 각각의 well에 glutathione reductase 20 μl, DTNB [5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] 16 μl, recycling mix 2 μl를 첨가한 후 40분 동안 반응을 시켰으며 ELISA microplate reader (EL808, BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

HepG2 세포를 6-well plates에 1 × 10^6 cells/ml으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 SCLE를 0.1 mg/ml 처리하여 24시간까지 배양하였다. SCLE가 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany)를 각 wells에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis하였다. Lysate는 chloroform 200 μl를 분주하여 15초간 섞었다. 그 후 12,000 × g 15분간 원심분리 하여 상층액을 isopropanol 500 μl이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000 × g 10분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate water (DEPC)를 75 : 25로 섞어 만든 75% ethanol를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 12,000 × g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 μl씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 μl에 0.1% DEPC water를 995 μl를 첨가하여 260 nm에서 흡광 측정하여 total RNA양을 정량하였다.

First strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRiert Platinum cDNA snythesis Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였다. 추출한 RNA (2 μg)와 RNase free water로 9 μl을 맞추고 70℃에서 5분간 반응시킨 후 2 × cDNA synthesis 완충용액 10 μl, cDNA synthsis Enzyme Mix 1 μl를 섞어 11 μl씩 각 PCR tube에 더한 후 25℃에서 5분, 42℃에서 60분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

RT-PCR

GLUT-2, GLUT-4 및 HNF-1α의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 1과 같다. PCR tube에 Go Tag Green Master (Promega, Madison, WI, USA) 10 μl, forward primer (15 μM)와 reverse primer (15 μM)를 각각 0.5 μl, nuclease free water 8 μl, 합성한 first-stand cDNA 1 μl를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR를 실행하였으며 각각의 primer의 PCR조건은 Table 2와 같다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 UV 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

HepG2 cell fractionation

HepG2 세포를 6-well plates에 2.5 × 10^6 cells/ml로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 SCLE를 처리하여 24시간 또는 48시간 동안 더 배양한 다음 4℃로 cooling된 PBS로 3회 세척한 후 scraper를 이용하여 세포를 harvesting한다. 원심분리

Table 1. PCR primer sequences

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
GLUT-2	Forward	GAT GAA CTG CCC ACA ATC TC
	Reverse	CTG ATG AAA AGT GCC AAG TG
GLUT-4	Forward	GTT AAT CGG CAT TCT GAT CG
	Reverse	GTG AAG ACT GTG TTG ACC AC
HNF-1α	Forward	GAA TGC ATC CAG AGA GGG GT
	Reverse	GTG GAC CTT ACT GGG GGA GA
β-actin	Forward	ACA GGA AGT CCC TTG CCA TC
	Reverse	AGG GAG ACC AAA AGC CTT CA

Table 2. PCR condition of each primer

Gene	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
GLUT-2	94℃ 5min	94℃ 30sec	59℃ 30sec	72℃ 30sec	72℃ 5min
			26cycle		
GLUT-4	94℃ 5min	94℃ 30sec	59℃ 30sec	72℃ 30sec	72℃ 5min
			30cycle		
HNF-1α	94℃ 5min	94℃ 30sec	57℃ 30sec	72℃ 30sec	72℃ 5min
			25cycle		
β-actin	94℃ 5min	94℃ 30sec	55℃ 30sec	72℃ 30sec	72℃ 5min
			18cycle		

(5,000 rpm, 5 min)를 통해 세포를 모은 후 cell fractionation kit (Cell signaling technology, Tokyo, Japan)의 사용방법에 따라 세포 분획을 진행하였다. 즉, 세포가 담긴 tube에 250 μl의 cytoplasm isolation buffer를 넣고 5초 동안 vortexing한 후 ice에 5분 동안 정치한다. 원심분리 (500 × g, 5 min)를 통해 cytoplasmic fraction (상등액)을 분리하고 pellet은 membrane isolatopn buffer 250 μl를 넣고 15초 동안 vortexing한 후 ice에 다시 5분 동안 정치한다. 원심분리 (8,000 × g, 5 min)를 통해 membrane fraction (상등액)을 분리한 후 pellet은 다시 nucleus isolation buffer 125 μl를 넣고 sonication하여 nuclear fraction을 확보하였다.

Western blot analysis

HepG2 세포를 6-well plates에 1 × 10^6 cells/ml로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 SCLE를 처리하여 24시간 또는 48시간 동안 더 배양한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 이용하여 4℃에서 용해시킨 후 원심분리 (14,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 얻은 단백질의 농도를 측정하였다. 동일한 양의 단백질 (30 μg)과 β-mercaptoethanol를 포함한 sample buffer를 1 : 1로 혼합한 후 100℃에서 3분간 가열하였다. 준비된 단백질샘플은 Bio-Rad mini-gel system를 이용하여 SDS-PAGE 후 polyvinylidene fluoride membrane (0.45 μm, PVDF transfer membrane, Thermo, Rockford, IL, USA)으로 단백질을 전이하였다. Membrane은 0.1% Tween 20과 5% Skim milk를 함유한 Tris-buffered saline (TBS)에 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 GLUT-2 (200 : 1) 또는 HNF-1α (500 : 1) 1차 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 buffer에서 1시간 동안 반응한 후 TBS-T (TBS containing 0.1% tween-20)로 5분간 3차례에 걸쳐 세척하였다. 그런 다음 membrane은 2차 anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 buffer를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응한 후 5분 단위로 3차례에 걸쳐 세척하였다. 발색은 enhanced chemiluminescence method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다. 그 밴드의 강도는 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다. 내부표준단백질은 actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다.

Glucokinase (GK) 활성 측정

Glucokinase 활성은 hexokinase colorimetric assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. Glucokinase 활성에 의해 생성된 glucose-6-phosphate (G6P)가 G6P dehydrogenase (G6PDH)와 반응할 때 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$)가 NADPH로 환원되는 것을 이용하여 glucokinase 활성도를 측정하는 원리이다. 실험은 *Bacillus stearothermophilus* 유래의 glucokinase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 unit과 SCLE (1 mg/ml)를 각각 50 μl씩 분주하여 혼합한 후 실온에서 20분 동안 incubation하였다. 각 well 당 assay buffer 34 μl, enzyme Mix 2 μl, developer 2 μl, coenzyme 2 μl, hexokinase 10 μl을 처리한 후 450 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. 측정 후 NADH 정량곡선을 이용하여 아래의 식으로 계산하였다.

$$= Sample\ Hexokinase\ activity = \frac{B}{(\Delta T \times V)} \times Dulution\ factor = mU/ml$$

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (Statitical Package for Social Sciences) program을 이용하여 mean ± SD로 표시하였고, one-way ANOVA test 후 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

청미래덩굴 잎 물 추출물 (SCLE)의 세포독성 및 glucose uptake 활성

SCLE가 HepG2 세포에 미치는 세포독성 및 glucose uptake 활성을 측정한 결과는 각각 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 1의 세포독성 실험은 SCLE 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 농도에서 확인한 결과로 모든 농도에서 독성이 관찰되지 않았다. Glucose uptake는 2-deoxyglucose (2-DG)의 세포내 축적량을 측정함으로써 평가되는데, 유의한 효능이 나타나는 최소 농도를 테스트한 결과 (data not shown) 0.25 mg/ml에

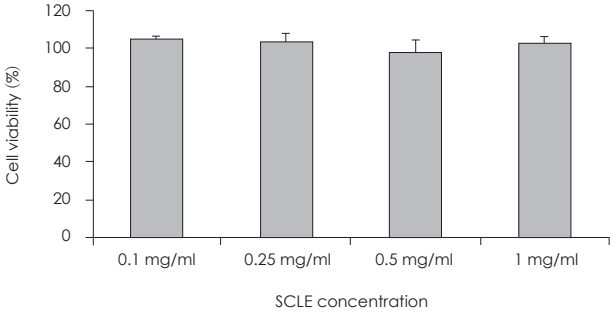

Fig. 1. Concentration-dependent effects of SCLE on HepG2 cell growth. Cell viability was analyzed using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay kit. Each bar is the Mean ± SD, derived from three independent experiments.

서 활성이 관찰되었으며 향후 포도당 흡수에 관련된 실험은 0.25 mg/ml에서 수행하였다. SCLE 0.25 mg/ml을 처리하여 glucose uptake 활성변화를 실험한 결과 대조군과 비교하였을 때 인슐린을 처리하지 않은 군에서는 SCLE의 처리에 의해 52.28 ± 2.15 pmol에서 77.86 ± 3.62 pmol로 유의한 증가를 보였지만 인슐린을 처리한 군에서는 112 ± 4.12 pmol에서 108.21 ± 7.92 pmol로 SCLE의 처리가 통계적으로 유의성 있는 변화를 유도하지 않았다.

SCLE가 GLUTs mRNA 발현에 미치는 영향

간의 주요 glucose transporter (GLUT)인 GLUT-2와 인슐린 의존적으로 포도당 운반에 관여하는 GLUT-4의 mRNA 발현을 HepG2 세포에서 관찰한 결과 Fig. 3와 같은 결과를 확인할 수 있었다. GLUT-2의 발현이 포도당에 의해 유도된다는 것은 Nordlie 등[17]의 연구결과에서 보고된 바 있다. 본 실험에서도 L (1 mM), N (5 mM), H (25 mM)로 포도당의 농도를 증사시켰을 때 GLUT-2의 발현이 증가되는 것이 확인되었으며 SCLE (0.25 mg/ml)의 처리는 포도당에 의해 증가된 GLUT-2의 발현양을 통계적으로 유의하게 더욱 증가시켰다. 1 mM의 포도당 배지에서 SCLE의 처리는 GLUT-2의 mRNA 발현을 유도하지 못하였지만 5 mM, 25 mM 포도당 배지에서는 SCLE의 처리를 통해 각각 39%, 35%의 발현 증가를 유도하였다. GLUT-4는 인슐린 의존적으로 발현이 유도되며 조직특이성이 있지만 포도당은 GLUT-4의 발현을 강하게 자극하지 못하는 것으로 알려져 있으며 몇몇 세포 또는 조직에서는 고농도의 포도당이 발현을 감소시키는 것으로 알려져 있다.[26] 본 실험의 결과에서는 HepG2 세포에 포도당 농도를 증가시킬수록 GLUT-4의 발현이 증가하는 현상은 관찰되었으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었으며, SCLE의 처리에 의해서도 GLUT-4 mRNA의 발현은 증가하지 않았다. 인슐린 부재 상태에서 실험이 진행된 이유도 있겠지만, 이는 Fig. 1에서 확인한 바 있는 인슐린 의존적인 glucose uptake가 HepG2 세포에서 관찰되지 않는 결과와 관련 있을 것이라 판단된다.

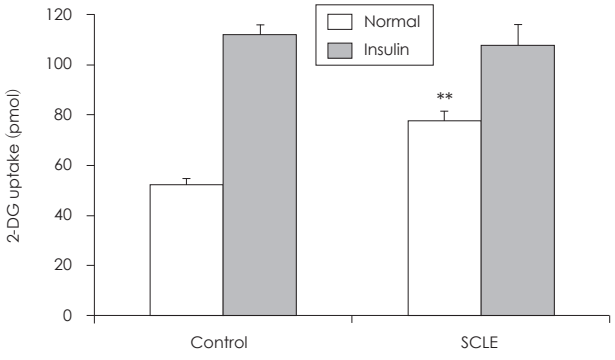

Fig. 2. Induction of glucose uptake following *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) treatment. HepG2 cells were incubated for 20 min in a KRPH buffer containing SCLE (0.25 mg/ml). The 2-deoxyglucose (2-DG) assay was performed 20 min later, as detailed in "Methods." The 2DG uptake was expressed in pmol in normal and insulin conditions. Results are presented as the Mean ± SD of three independent experiments. **: $p < 0.01$, Normal control versus Normal + SCLE.

SCLE가 GLUT-2 단백질 발현에 미치는 영향

Fig. 3의 mRNA 발현실험을 바탕으로 GLUT-2의 단백질 발현을 확인한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 확인할 수 있었다. mRNA 발현에 영향을 미치지 못한 l (1 mM)을 제외하고 SCLE처리 효과가 관찰된 N (5 mM)과 H (25 mM)의 포도당 농도에서 0.25 mg/ml SCLE을 처리한 결과 48시간까지 단백질의 양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. N 농도의 포도

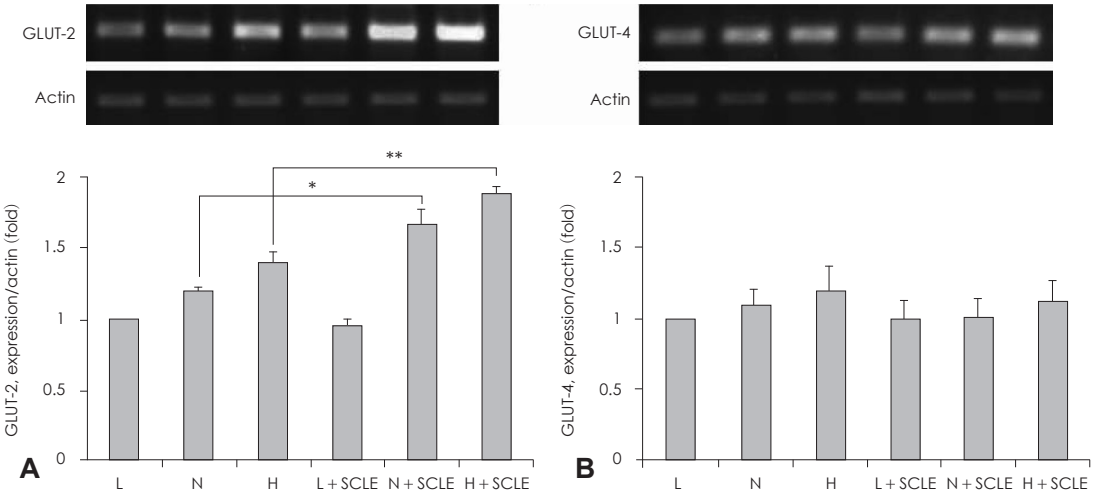

Fig. 3. Measurement of GLUT-2, -4 mRNA expression. A: Effect of a *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) treatment on GLUT-2 mRNA expression in HepG2 cells. B: Effect of SCLE treatment on GLUT-4 mRNA in HepG2 cells. Values are the Mean ± SD of triplicate determinations. *: $p < 0.05$, N versus N + SCLE, **: $p < 0.01$, H versus H + SCLE. L: Low glucose levels (1 mM) N: Normal glucose levels (5 mM) H: High glucose levels (25 mM).

당에서 SCLE의 처리 후 24시간에서 GLUT-2 단백질 발현양이 약 2.5배 증가한 것을 확인할 수 있었고 48시간에서 약 4배까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. H 농도의 포도당에서는 24~48시간까지 GLUT-2 단백질이 약 3배 증가한 것을 확인할 수 있었다. H 농도의 포도당에서 GLUT-2의 발현 배수가 낮은 것은 초기 0시간 GLUT-2의 단백질 발현양이 N 농도의 포도당에서 보다 높기 때문인 것으로 판단된다. SCLE의 처리에 따른 GLUT-4의 단백질 발현의 변화는 관찰되지 않았다 (data not shown).

SCLE가 transcription factor HNF-1α의 발현에 미치는 영향

GLUT-2의 promoter에 작용하는 transcription factor 중 하나로 알려진 HNF-1α[20]의 mRNA 및 단백질 발현을 확인한 결과 Fig. 5와 같다. Fig. 5A에서 HNF-1α의 mRNA 발현을 확인한 결과, N (5 mM)농도의 포도당에서 HNF-1α는 3~6시간에 0시간과 비교하여 약 20% 이상의 통계적으로 유의한 발현 증가를 확인할 수 있었으며 12시간 이후 0시간과 유사한 수준으로 발현이 감소함을 알 수 있었다. 그리고 H (25 mM)농도의 포도당에서 HNF-1α는 3시간 이후 지속적으로 유의한 수준의 증가된 발현양을 유지하는 것으로 관찰되었다. 이를 통해 HNF-1α가 포도당 농도에 따라 유의하게 반응하는 유전자임을 확인할 수 있었다. Fig. 5B를 통해 HNF-1α의 단백질 발현을 확인한 결과 N농도의 포도당에서 HNF-1α는 24시간에 높은 발현을 보이다가 48시간에 0시간과 유사한 수준의 단백질 양으로 감소하는 것을 확인할 수 있었고 H농도의 포도당에서 HNF-1α는 N농도와 유사하게 24시간에 가장 높은 발현양을 보이다가 48시간에 소폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 통계적인 유의성은 확인하기 어려웠지만 48시간에도 0시간 보다 높은 수준의 단백질 발현을 유지하고 있었다.

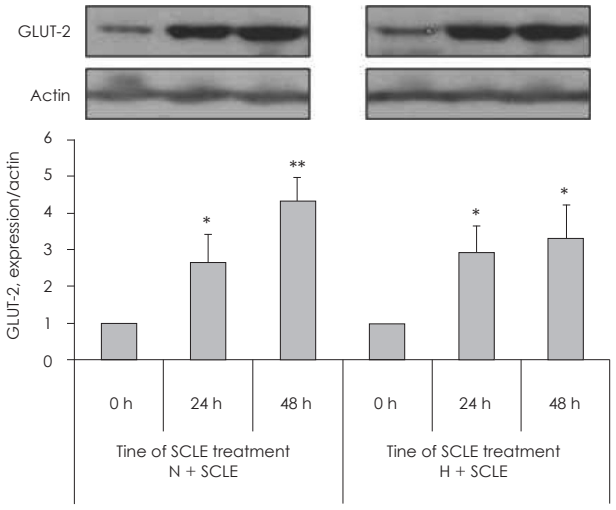

Fig. 4. Measurement of GLUT-2 protein expression. Time-dependent effects (at 0 h, 24 h, and 48 h) of treatment with a *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) on GLUT-2 expression in HepG2 cells cultured with 5 mM or 25 mM glucose. Values are the Mean ± SD of triplicate determinations. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with 0 h N: Normal glucose levels (5 mM) H: High glucose levels (25 mM).

시간에 따른 HNF-1α의 단백질발현 변화가 명확했던 N농도의 포도당 배지에서 0.25 mg/ml SCLE를 24시간 처리한 후 HepG2 세포를 cytosol과 nucleus로 분획하여 HNF-1α의 단백질발현을 확인한 결과 Fig. 6과 같다. MEK1/2와 histone H3 antibody로 cytosol과 nucleus 분획을 확인하였다. HNF-1α 단백질 발현을 확인한 결과 SCLE 처리군의 nucleus 분획에서 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

SCLE가 Glucokinase (GK)의 활성에 미치는 영향

GK는 세포내로 흡수된 포도당을 G6P로 전환하여 해당과정을 유도하는 첫 번째 효소이다.[13] 이런 이유로 앞에서 언급

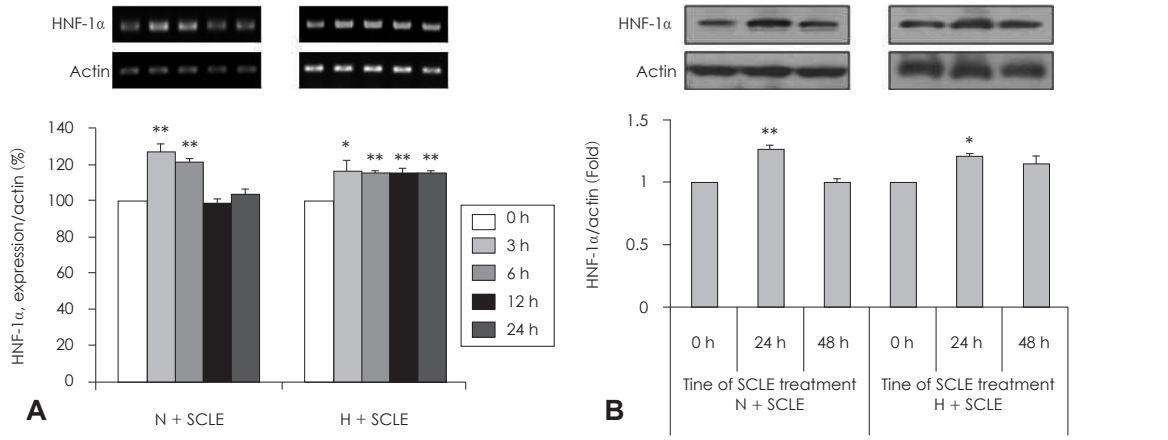

Fig. 5. Measurement of HNF-1α mRNA and protein expression. A: Effect of a *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) on HNF-1α mRNA expression in HepG2 cells. B: Effect of SCLE treatment on HNF-1α protein expression in HepG2 cells. Values are Mean ± SD of triplicate determinations. *: $p < 0.05$, N versus N + SCLE, **: $p < 0.01$, H versus H + SCLE N: Normal glucose levels (5 mM) H: High glucose levels (25 mM).

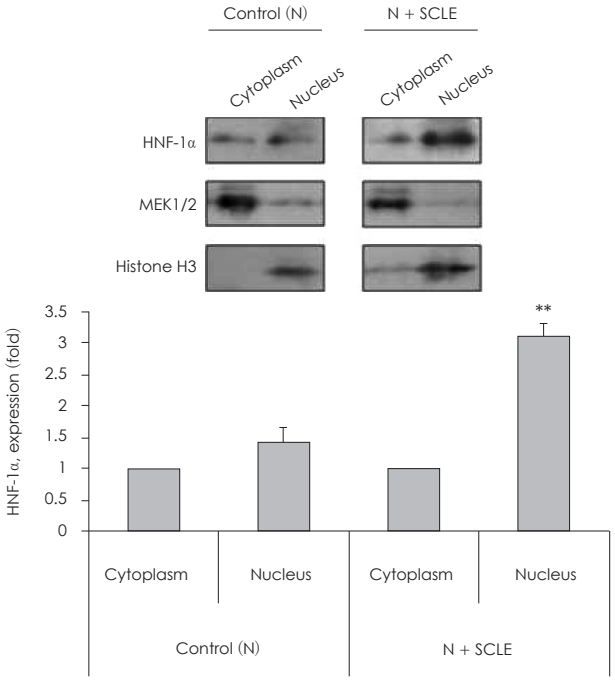

Fig. 6. Measurement of HNF-1α expression in nucleus fraction. Effect of *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) on HNF-1α protein expression in HepG2 cell fractions. Values are Mean ± SD of triplicate determination. **: $p < 0.01$ comparing cytoplasm and nucleus. N: Normal glucose level (5 mM).

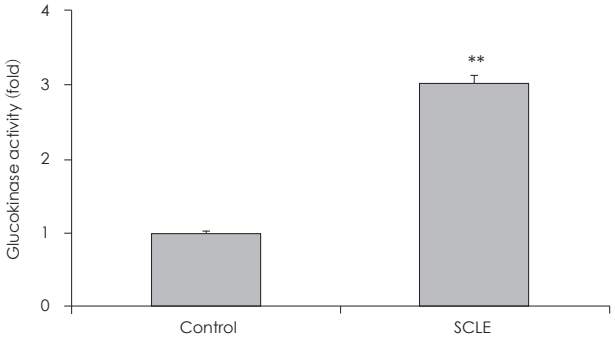

Fig. 7. *In vitro* assay to evaluate glucokinase activity. Effect of treatment with a *Smilax china* L. leaf extract (SCLE) on glucokinase (GK) from *Bacillus stearothermophilus*. Values are the Mean ± SD of triplicate determinations. **: $p < 0.01$, control versus SCLE (0.25 mg/ml).

한 바와 같이 최근의 연구에서 GK를 활성화 하여 혈당을 강하시키려는 시도가 진행되고 있다. 본 연구에서 SCLE의 처리를 통해 GK의 활성변화를 측정한 결과 Fig. 7과 같은 결과를 확보하였다. *Bacillus stearothermophilus* 유래의 GK를 이용하여 활성을 측정한 결과 SCLE (0.25 mg/ml)에 의해 그 활성이 control 대비 약 3배 증가하는 것을 확인하였다.

고 찰

청미래덩굴은 전통의학에서 이뇨작용과 해독작용이 있어 매독, 창독, 만성피부병, 수은 중독성 피부염, 풍습성 관절염, 콩팥염, 방광염 등에 활용되었고 최근 연구에서는 항산화활성 및 항균활성과 α-glucosidase inhibition효과가 알려져 그 활용 범위가 넓어지고 있다.[2-4] 본 실험에서는 청미래덩굴 잎 물 추출물 (SCLE)을 이용하여 아직 시도된 적이 없는 포도당 흡수 기전 및 포도당 대사관련 연구를 수행하였다. 그 결과 SCLE의 처리가 HepG2 세포에서 인슐린 비의존적인 방법으로 glucose uptake를 유도한다는 것을 확인할 수 있었으며 이를 통해 SCLE가 인슐린 비의존적인 당뇨환자에게 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 아직 연구가 충분히 진행된 결과가 아니므로 추가적인 인슐린 비의존적 신호기전에 SCLE가 미치는 영향에 관한 연구와 인슐린 저항성이 유도된 실험모델에서의 추가 검증이 필요할 것이다.

SCLE에 의한 glucose uptake실험 결과를 바탕으로 포도당의 흡수증가가 어떻게 이루어지는지 확인하기 위해 간에서 주요 포도당 운반체로 기능하는 GLUT-2의 발현변화를 통해 확인하였다. 그 결과는 앞의 Fig. 2에서 설명한 바와 같이 GLUT-2는 SCLE에 의해 발현이 증가되었으나 인슐린 신호에 의해 자극되는 GLUT-4는 SCLE에 영향을 받지 않았다. 이는 SCLE가 인슐린 비의존적으로 glucose uptake를 증가시킨 결과와 함께 설명이 가능할 것으로 판단된다. SCLE의 처리에 의해 HepG2 세포에서 GLUT-2의 발현이 증가한다는 것은 잠재적으로 간에서 GLUT-2의 발현을 유도하여 포도당의 흡수 및 이동에 도움을 줄 수 있다는 것을 의미하므로 그 활용이 기대되는 부분이다. GLUT-2 mRNA의 발현 증가에 있어서 L (1 mM) 농도의 포도당에서는 SCLE가 영향을 미치지 못하다가 N (5 mM) 또는 H (25 mM)의 포도당 농도에서 발현을 유도하는 결과가 확인되는데 이는 SCLE가 일정 농도 이상의 포도당 상태에서만 GLUT-2의 유전자 발현에 영향을 미치는 것을 의미한다. 이런 SCLE의 작용은 GLUT-2가 일정 농도 이상의 고농도 포도당상태에서 발현이 증가하여 활성을 갖는 특성[13,17]을 도와주는 것으로 생각된다. 또한 GLUT-2는 췌장 β-cell에서 포도당 sensing을 통한 insulin의 분비를 유도하므로[18] 이에 대한 연구 또한 필요할 것으로 판단된다. GLUT-2 mRNA 발현 확인 실험을 바탕으로 단백질 발현을 western blot으로 확인한 결과 SCLE의 처리에 의해 48시간 까지 안정적으로 GLUT-2단백질이 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 SCLE에 의해 증가된 mRNA가 안정적으로 단백질 합성에 영향을 미쳤으며 GLUT-2가 배지 내에 존재하는 포도당의 운반에 지속적으로 작용을 하고 있음을 의미한다. 이런 SCLE처리에 의한 GLUT-2의 발현이 어떻게 이루어졌는지 확인하기 위해 GLUT-2 promoter에 결합하는 transcription factor들을 검토하였다. 그 결과 HNF-1α, HNF-4α,

FOXA2, SREBP-1c, C/EBPβ 등[19]이 보고되어 있음을 확인하였고 그 중 HNF-1α와 C/EBPβ가 human GLUT-2의 promoter에서 연구된 것을 확인할 수 있었다.[20,21] SCLE의 처리에 의한 C/EBPβ의 발현 변화는 확인할 수 없었지만 (data not shown), HNF-1α의 mRNA 및 단백질 발현은 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 SCLE를 처리한 HepG2 세포의 nucleus 분획에서 HNF-1α 단백질의 발현증가가 뚜렷하게 확인되었다. 본 실험결과를 통해 HepG2 세포에서 SCLE의 처리에 의해 증가한 GLUT-2는 HNF-1α 단백질의 nucleus내 증가에 의한 것임을 유추할 수 있다. 명확한 발현조절 기전을 확인하기 위해서는 SCLE처리에 의해 증가된 HNF-1α가 GLUT-2 promoter에 결합하는지에 대한 연구가 추가 되어야 하지만 본 실험을 통해 그 유기적인 발현조절 가능성이 제시되었으며 증가된 HNF-1α와 GLUT-2 promoter의 결합은 HNF-1α의 조절에 의한 GLUT-2 발현 변화에 대한 다수의 연구결과를 통해 예측이 가능한 것으로 판단된다.[20,27,28]

지금까지의 실험결과를 통해 SCLE가 HepG2 세포에서 glucose uptake를 유도하는 작용기전은 HNF-1α의 발현유도를 통한 GLUT-2의 증가에 의한 것임을 알 수 있었다. 그 다음으로 본 실험은 SCLE에 의해 유입된 세포내 포도당은 어떻게 처리되는지에 대한 연구를 GK 활성 측정을 통해 실험하였으며 그 결과 Fig. 7에서 설명한 바와 같이 SCLE가 직접적으로 GK의 활성을 촉진하여 포도당을 인산화 하는 것을 확인하였다. 이렇게 인산화된 포도당은 기존의 많은 연구결과에서 알려진 바와 같이 간에서 glycogen 또는 지방으로 합성되어 저장되거나 에너지대사에 사용되어 소진되는 것을 예측할 수 있다.[13,29]

본 실험의 결과들을 통해 SCLE가 HepG2 세포에서 포도당의 흡수를 돕고 대사작용을 유도하는 것을 확인함으로써 향후 당뇨의 예방 및 치료를 위해 활용이 가능한 잠재적 후보 소재임을 확인할 수 있었으며, 아직 안전성과 구체적인 작용기전에 대한 다양한 연구가 추가되어야 하지만 SCLE의 새로운 기능과 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에는 SCLE를 이용하여 시도된 바가 없는 glucose uptake 유도 실험을 수행하여 HepG2 세포에서 포도당흡수가 증가함을 확인하였다. 또한 이런 포도당의 흡수는 HNF-1α라는 transcription factor의 활성화를 통해 GLUT-2의 발현을 증가시키기 때문인 것을 실험적으로 증명하였다. 뿐만 아니라 Bacillus stearothermophilus 유래의 GK를 이용하여 활성을 측정한 결과 SCLE가 직접적으로 GK를 활성화하여 포도당의 인산화에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었으며 그 실험결과들은 Fig. 8에서 도식화 하였다. 본 연구를 통해 SCLE가 α-glucosidase inhibition 활성에 의한 혈당의 개선과 당뇨예방 효과뿐만 아니라 다양한 세포내 기전을 통해 혈당 및 당뇨의 개선을 유도할 수 있음을 확인하였고, 이는 SCLE가 neutraceuticals 소재로서의 개발가치가 높음을 시사한다.

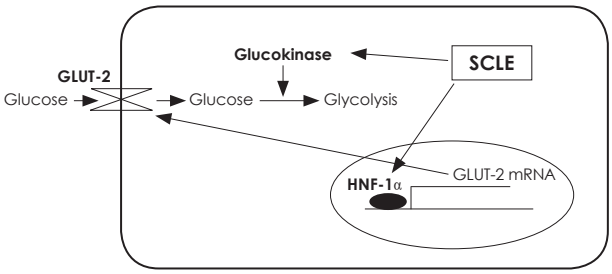

Fig. 8. Treatment with SCLE stimulates glucose absorption and utilization by increasing GLUT-2 mRNA expression and GK activity in HepG2 cells.

References

1. Ko YJ, Kim JY, Kim EJ, Kim EJ, Seol HG, Park GH, Chung GY, Ryu CH. Treatment of Smilax china L. root extract for improvement of storage stability of Mang-gae rice cake. Korean J Food Preserv 2012; 19(2): 167-172.
2. Kang HS, You HC, Choi Y, Kim HK, Jo SM, Yoon BJ. Effect of Smilax china L. Rhizome extract on heavy metal contents in rats. Korean J Food Nutr 2011; 24(2): 233-238.
3. Cha BC, Lee EH. Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of Smilax china linne. Korean J Pharmacogn 2007; 38(1): 31-36.
4. Kim KK, Kang YH, Kim DJ, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant, α-glucosidase inhibition and anti-inflammatory activities of the leaf and root extracts of Smilax china L. J Nutr Health 2013; 46(4): 315-323.
5. Bhati R, Singh A, Saharan VA, Ram V, Bhandari A. Pharmacognostical standardization, extraction and anti-diabetic activity of Smilax china L. rhizome. Asian J Tradit Med 2011; 6(5): 218-223.
6. Kim DH, Park SC, Lee JH, Lee HY, Cho MK, Choi JY, Kim SY, Park SH. Recent research trends in Korean medicine treatment of diabetes mellitus - Focusing on domestic articles from 2008 to 2013 -. J Korean Orient Intern Med 2013; 34(3): 240-255.
7. Lee DS, Jeong GS, An RB, Li B, Byun E, Kim YC. Search for plant extracts with protective effects of pancreatic beta cell against oxidative stress. Korean J Pharmacogn 2008; 39(4): 335-340.
8. Song S, Paik HY, Song Y. The relationship between intake of nutrients and food groups and insulin resistance in Korean adults: using the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV, 2007-2009). Korean J Nutr 2013; 46(1): 61-71.
9. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α-Glucosidase inhibitors from plants: a natural approach to treat diabetes. Pharmacogn Rev 2011; 5(9): 19-29.
10. Choung ES, Bak JP, Choi H, Jang GS, Kang SH, Kang SC, Zee OP. Effects of antidiabetic and GLUT4 gene expression of Acanthopanax senticosus extracts. Korean J Pharmacogn 2008; 39(3): 228-232.

11. Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, An Z, Cherrington AD. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. Adv Nutr 2012; 3(3): 286-294.
12. Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. Diabetes 1999; 48(5): 1198-1214.
13. Oosterveer MH, Schoonjans K. Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. Cell Mol Life Sci 2014; 71(8): 1453-1467.
14. Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. Biochim Biophys Acta 2008; 1778(4): 1091-1099.
15. Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide YH, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. J Hepatol 2009; 50(5): 883-894.
16. Nistor Baldea LA, Martineau LC, Benhaddou-Andaloussi A, Arnason JT, Lévy É, Haddad PS. Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. J Ethnopharmacol 2010; 132(2): 473-482.
17. Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. Annu Rev Nutr 1999; 19: 379-406.
18. Cerf ME. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. Med Sci Monit 2007; 13(1): RA12-RA17.
19. David-Silva A, Freitas HS, Okamoto MM, Sabino-Silva R, Schaan BD, Machado UF. Hepatocyte nuclear factors 1α/4α and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. Life Sci 2013; 93(22): 805-813.
20. Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y. Hepatocyte nuclear factor-1alpha recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. Diabetes 2002; 51(5): 1409-1418.
21. Kim JW, Ahn YH. CCAAT/enhancer binding protein regulates the promoter activity of the rat GLUT2 glucose transporter gene in liver cells. Biochem J 1998; 336 (Pt 1): 83-90.
22. Stevens BD, Litchfield J, Pfefferkorn JA, Atkinson K, Perreault C, Amor P, Bahnck K, Berliner MA, Calloway J, Carlo A, Derksen DR, Filipski KJ, Gumkowski M, Jassal C, MacDougall M, Murphy B, Nkansah P, Pettersen J, Rotter C, Zhang Y. Discovery of an intravenous hepatoselective glucokinase activator for the treatment of inpatient hyperglycemia. Bioorg Med Chem Lett 2013; 23(24): 6588-6592.
23. Lloyd DJ, St Jean DJ Jr, Kurzeja RJ, Wahl RC, Michelsen K, Cupples R, Chen M, Wu J, Sivits G, Helmering J, Komorowski R, Ashton KS, Pennington LD, Fotsch C, Vazir M, Chen K, Chmait S, Zhang J, Liu L, Norman MH, Andrews KL, Bartberger MD, Van G, Galbreath EJ, Vonderfecht SL, Wang M, Jordan SR, Véniant MM, Hale C. Antidiabetic effects of glucokinase regulatory protein small-molecule disruptors. Nature 2013; 504(7480): 437-440.
24. Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Kim KK, Choe M. Effects of medicinal plant water extracts on expression of anti-diabetic enzymes mRNA. J Korean Soc Food Sci Nutr 2013; 42(7): 1008-1014.
25. Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Lee JS, Choe M. Effects of medicinal herb water extracts on expression of hepatic glucokinase, pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase mRNA. Korean J Nutr 2013; 46(2): 119-125.
26. Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz PA. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. FASEB J 1994; 8(1): 43-53.
27. Párrizas M, Maestro MA, Boj SF, Paniagua A, Casamitjana R, Gomis R, Rivera F, Ferrer J. Hepatic nuclear factor 1-alpha directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. Mol Cell Biol 2001; 21(9): 3234-3243.
28. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1α. J Virol 2012; 86(23): 12903-12911.
29. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. Biochem J 2008; 414(1): 1-18.