

Cudrania tricuspidata Fruit Extract Ameliorates Free Fatty Acid-induced Lipid Accumulation in HepG2 Cells

Hyo-Jeong Lee, Se-Eun Park and Seung Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Gwangju University, Gwangju 61743, Korea

Received September 5, 2019 / Revised October 22, 2019 / Accepted October 24, 2019

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic liver disease associated with various metabolic syndromes, such as obesity, dyslipidemia, hypertension, and diabetes. *Cudrania tricuspidata* is a medicinal plant distributed widely in Asia and has been used in clinical practice to treat various diseases. The aim of this study is to determine the lipid-lowering effects of *C. tricuspidata* fruit extract (CTE) using a cell model induced by free fatty acids (FFAs). HepG2 cells were exposed to 1mM FFAs (palmitic acid:oleic acid = 2:1) for 24 hr to simulate the conditions of NAFLD in vitro. CTE attenuated the increases of lipid accumulation, intracellular triglyceride, and cholesterol content and inhibited 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) activity in the HepG2 cells in a dose-dependent manner. Also, CTE inhibited the protein expression of lipogenesis-related genes, such as sterol regulatory element-binding protein-1/-2 (*SREBP-1/-2*), fatty acid synthase (*FAS*), and stearoyl CoA desaturase-1 (*SCD-1*) in FFAs-induced lipid accumulation in HepG2 cells. In addition, CTE-induced adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in HepG2 cells. These results suggest that CTE attenuates hepatic lipid accumulation by inhibiting lipogenesis through the modulation of the AMPK signaling pathway on FFAs-induced lipogenesis in HepG2 cells and may potentially prevent NAFLD.

Key words : AMPK, *Cudrania tricuspidata* fruits, HepG2, lipogenesis, non-alcoholic fatty liver disease

서 론

비알코올성 지방간 질환(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)은 간 조직 내 비정상적으로 지방이 과다하게 축적되어 있는 상태로 만성 간 질환 중 가장 흔한 질환이다[10, 35]. 체내 유리지방산은 간으로 유입되어 중성지방 합성의 원료가 되는데 과도한 탄수화물을 포함하는 식이는 유리 지방산의 생성을 급격하게 증가시켜 간에서의 유리 지방산 흡수를 증가시키고 탄수화물 대사로부터 중성지방의 생성을 증가시켜 간에서의 중성 지방 합성량이 분해량을 초과하며 NAFLD이 발생하게 된다[5, 28]. NAFLD은 단순 지방증(simple steatosis)부터 비알코올성 지방간염(Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH), 간경변증(liver cirrhosis)까지 다양한 병리학적 간 질환을 포함하며, 비만, 당뇨, 이상지질혈증 및 고혈압과 같은 대사증후군과 밀접하게 관련되어 있다[11, 30]. 전세계적으로 비만 인구 증가와 동시에 NAFLD의 발생 역시 급격하게 증가하고 있으며 한국에서도 식습관 변화, 비만, 당뇨 인구의 증가

로 비알코올성 지방간질환 환자가 급격하게 증가하고 있다 [35, 40]. NAFLD의 예방과 치료를 위해 체중조절, 운동, 식이 요법 및 약물이 사용되고 있으며[6] NAFLD 치료제로 항비만제(Orlistat), 지질 강하제(statins, fibrates), 혈당강하제(metformin, thiazolidinediones), 항산화제(vitamin E)가 사용되고 있다[2]. 이들 치료제들은 간에 특이적으로 작용하지 않으며 장기간 적용 시에 부작용 발생이 증가한다는 단점이 있어 천연물을 이용하여 안전하고 부작용을 최소화한 효과적인 소재의 개발이 요구되고 있으며, 최근 연구를 통해서 차나무, 치커리, 블루베리, 뽕나무 및 나도공단풀 등이 간 조직 내 지방 축적을 억제시킨다는 연구가 보고되어 있다[3, 4, 24, 25, 30, 41].

Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)는 지방생성과 관련된 인자들의 발현 조절에서 중요한 역할을 한다. AMPK의 활성화는 지방생성을 억제하고 지방산 합성에 관여하는 substrate인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 활성화를 조절하며, 지방생성과 지방산 및 중성지방 합성에 관여하는 sterol regulatory element-binding protein-1 (*SREBP-1*), fatty acid synthase (*FAS*) 및 stearoyl CoA desaturase-1 (*SCD-1*)의 발현, 콜레스테롤 합성에 관여하는 *SREBP-2*, HMG-CoA reductase의 발현을 조절한다[1, 7, 35, 40]. 여러 연구들을 통해서 NAFLD와 연관되어 있는 비만/당뇨 환자의 조직 내에 AMPK의 활성이 감소됨이 보고되었으며, rosiglitazone, metformin, alpha-lipoic acid와 같은 치료제들의 AMPK 활성화 유도를 증명하는 연구가 보고되었다[19, 21].

*Corresponding author

Tel : +82-62-670-2718, Fax : +82-62-670-2761

E-mail : seungk@gwangju.ac.kr

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.

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 한국을 포함한 동북아시아에 분포하며 예로부터 줄기는 약재로 잎과 열매는 식용으로 이용되고 있다[9, 22]. 다수의 연구들을 통해서 꾸지뽕 잎, 줄기, 열매는 항산화, 항염증, 항비만 및 간보호와 같은 다양한 생리학적 효과가 보고되어 있다. NAFLD와 관련된 연구로 꾸지뽕 잎/줄기는 lipase 활성 억제, 혈중 중성지방 감소, 지방 흡수 지연, 혈당 강하 효과 및 인슐린 저항성 개선에 대해 보고되어 있으며 열매는 pancreatic lipase 억제 활성, 항비만 효과에 대해서 보고되었다[17, 19, 21, 32, 41].

따라서 본 연구에서는 유리 지방산에 의해 지방 축적이 유도된 HepG2 세포를 이용하여 꾸지뽕 열매 추출물의 억제 효과 및 그 작용기전에 대해 확인하였으며, NAFLD에 대한 기능성 소재로 활용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

꾸지뽕 열매 추출물 제조

건조된 꾸지뽕 열매 50 g과 70% 에탄올 300 ml를 혼합한 후, 40°C에서 24시간 동안 교반하면서 유효성분을 추출하였다. Filter paper를 이용하여 여과한 후, 여과된 추출물은 감압 농축기(Eyela rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축된 열매 추출물은 동결 건조한 후 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

세포 배양

HepG2 세포는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포 내 지질 축적을 위해, HepG2 세포를 6 well-plate에 1×10⁶ cell/well로 분주하고 세포 밀도가 약 80%에 도달했을 때, serum free DMEM으로 교체하고 24시간 배양한 후 1 mM 유리 지방산(0.33 mM palmitic acid+0.66 mM oleic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 꾸지뽕 열매 추출물을 24시간 처리하였다. 대조군은 배지에 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 처리하였다.

세포 생존율 측정

HepG2 cell은 96 well-plate에 4×10⁴ cells/well로 분주한 후 꾸지뽕 열매 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 5 mg/ml 농도로 10 μl를 각 well에 처리하고 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 각 well에 생성된 crystal formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μl를 이용하여 용해시킨 후, ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil Red O 염색

HepG2 세포를 6 well-plate에 분주하고 유리 지방산과 꾸지뽕 열매 추출물을 24시간 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS, Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 세척하고 formaldehyde를 이용하여 실온에서 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 Oil Red O 염색시약(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 넣어 실온에서 1시간 동안 염색하였다. 염색한 세포를 증류수로 세척한 다음 흡광도 측정을 위해 200 μl Isopropanol로 염색된 세포를 용출시켜 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

중성지방 및 콜레스테롤 함량 분석

세포 내 중성지방 및 콜레스테롤 함량을 측정하기 위해, HepG2 세포를 6 well-plate에 1×10⁶ cell/well로 분주하고 유리 지방산과 꾸지뽕 열매 추출물을 24시간 동안 처리하였다. 중성지방 및 콜레스테롤 함량은 assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 제조사에서 제공한 분석방법에 따라 수행하였다. 배양액 및 세포 내 단백질 함량은 BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 진행하였으며, protein standard는 BSA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다.

HMG-CoA reductase activity 분석

HepG2 세포를 6 well-plate에 추출물과 유리 지방산을 16시간 동안 처리한 후 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) activity 억제를 확인하기 위해 activity assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 제조사에서 제공한 분석방법에 따라 수행하여 확인하였다.

Western blot을 이용한 단백질 발현 분석

처리가 완료된 세포를 PBS로 세척하고 RIPA buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 단백질을 용출시킨 후, BCA protein assay kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질 정량을 수행하였다. 단백질을 SDS gel에 전기영동하고 PVDF membrane (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)에 transfer하였다. membrane을 blocking solution (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20, 5% nonfat milk)에 넣고 blocking하고 각 단백질에

대한 1차 항체를 반응시켰다. TBST (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20) 용액으로 membrane을 세척한 후 horseradish peroxydase (HRP)가 결합된 2차 항체를 희석하여 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane을 세척하고 ECL detection kit (ThermoFisher, Waltham, MA USA)를 이용하여 발광시킨 후 image reader (Microchemi 4.2, DNR, Neve Yamin, IS)로 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며, 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 결과에 대한 유의성 검증은 대조군과 비교하여 student's test에 의해 판단하였으며 p 값이 0.05 미만일 경우에 통계적으로 유의성 있는 결과로 판단하였다.

결과 및 고찰

꾸지뽕 열매 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

꾸지뽕 열매 추출물에 의한 세포 생존율 변화를 알아보기 위하여 HepG2 세포를 이용하여 MTT assay를 수행하였다. 세포주를 96 well에서 배양한 후 추출물을 0~500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석하여 24시간 동안 처리한 후 세포 생존율 변화를 확인하였다(Fig. 1). 300 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포 생존율에서 큰 변화를 나타내지는 않았으며 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 100% 이하로 세포 생존율이 감소하였다. 세포 생존율이 감소하지 않았던 500 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 다음 실험을 진행하였다. 꾸지뽕 열매 추출물의 세포독성은 지방 축적 억제 효과를 나타내는 다른 에탄올 추출물을 연구한 결과와 비교했을 때, HepG2 세포에 대해 비교적 세포독성이 높지 않은 것으로 사료된다[8, 12, 18, 33].

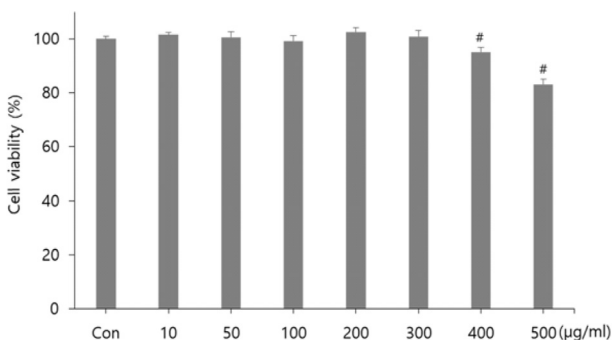


Fig. 1. Effects of *Cudrania tricuspidata* fruits extracts on cell viability in HepG2 cells. The cells were incubated with extract for 24 hr. The cell viability was determined by MTT assay. The values were calculated as a percentage of cell viability of the control cells not treated with extract. The data presented are the means \pm S.E.M. of three independent experiments. # $p < 0.05$ vs. control group.

꾸지뽕 열매 추출물이 지방 생성에 미치는 영향

Park 등은 꾸지뽕 열매 추출물이 분화된 지방세포에서 지방구 생성 및 중성지방 생성을 억제하는 것으로 보고한 바 있으며, Jo 등은 꾸지뽕 열매 함유 isoflavonoid가 고지방식에 의한 비만모델에서 항비만 효과를 나타냄을 보고한 바 있다[15, 32]. 또한 꾸지뽕 잎, 줄기 추출물과 함유성분들이 항비만 활성을 가지며 간 조직 내 지방 축적 및 중성지방 생성을 억제하는 것으로 보고된 바 있다[13, 16, 17, 20].

꾸지뽕 열매 추출물의 지방 생성 억제 효과를 확인하기 위해 추출물과 1 mM 유리지방산을 24시간 처리한 후 Oil-Red-O 염색시약을 이용하여 HepG2 세포의 지방 생성 정도를 확인하였다. 세포 내 지방 축적의 정도를 보면 유리지방산만 단독으로 처리한 군에 비해 꾸지뽕 열매 추출물 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 지방 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 한편, 유리 지방산과 꾸지뽕 열매 추출물을 처리하였을 때 세포 생존율은 감소하지 않은 것으로 확인되었으며 이는 꾸지뽕 열매 추출물에 의한 지방 축적 억제효과가 HepG2 세포에 대한 독성 효과는 아닌 것으로 사료된다(Fig. 2B).

같은 조건으로 처리한 HepG2 세포의 중성지방 생성량을 측정된 결과 유리지방산만 단독으로 처리한 군에 비해 꾸지뽕 추출물 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 중성지방 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2C).

꾸지뽕 열매 추출물이 콜레스테롤 생성에 미치는 영향

꾸지뽕 추출물의 콜레스테롤 생성 억제 효과를 확인하기 위해 HepG2 세포에 1 mM 유리지방산과 꾸지뽕 열매 추출물을 처리한 후, 콜레스테롤 생합성 단계에서 작용하는 rate-limiting enzyme인 HMG-CoA reductase의 활성 억제 및 콜레스테롤 생성 억제 효과를 확인하였다. 유리지방산만 단독으로 처리한 군에 비해 꾸지뽕 열매 추출물 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 콜레스테롤 생성이 억제되는 것을 확인하였으며(Fig. 3A) 콜레스테롤 생성 억제 결과와 마찬가지로 꾸지뽕 열매 추출물을 처리하였을 때 HMG-CoA reductase 활성이 감소함을 확인하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 꾸지뽕 열매 추출물이 복분자 추출물의 연구 결과와 마찬가지로 콜레스테롤 생성 효소인 HMG-CoA reductase의 활성 억제를 통해서 콜레스테롤 생성 저해효과를 나타냄을 제시한다[23].

꾸지뽕 열매 추출물이 지질 대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향

SREBPs는 지방산, 콜레스테롤, 중성지방, 인지질의 합성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하는 중요한 전사인자이다. SREBP-1은 FAS 및 SCD-1과 같은 지방산과 중성지방 합성과 관여하는 유전자의 발현을 조절하고 SREBP-2는 HMG-CoA

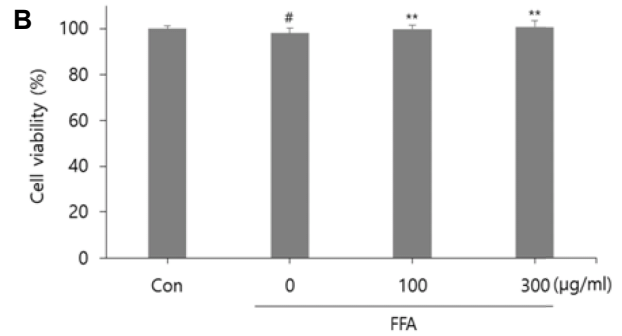
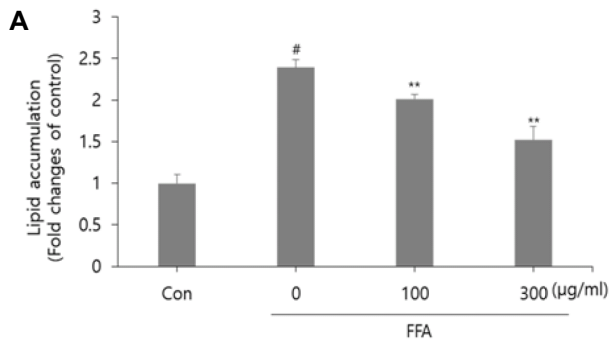


Fig. 2. Effect of *Cudrania tricuspidata* fruits extract on lipid accumulation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of extract in the absence or presence of FFA for 24 hr. (A) The cells were stained with Oil Red O dye, and the quantity of lipid contents was analyzed using a spectrometer at 520 nm. (B) Cell viability was determined by MTT assay. (C) Intracellular triglyceride was analyzed using the enzymatic colorimetric method. The data presented are the means ± S.E.M. of three independent experiments. # $p < 0.05$ vs. control group; ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. free fatty acid group.

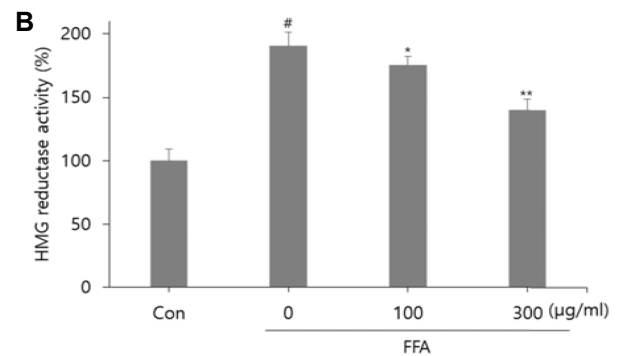
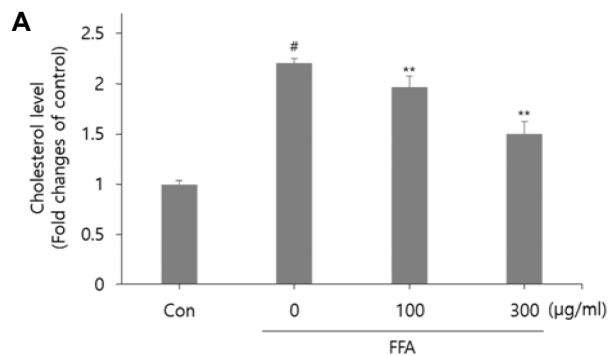
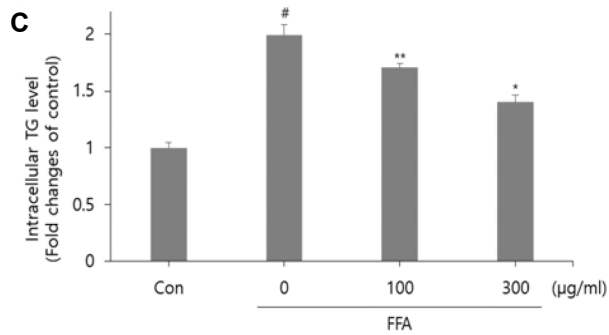


Fig. 3. Effects of *Cudrania tricuspidata* fruits extract on cholesterol production in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of extract in the absence or presence of FFA for 24 hr. (A) Cholesterol levels and (B) HMG-CoA reductase activity were analyzed using the enzymatic colorimetric method. The data presented are the means ± S.E.M. of three independent experiments. # $p < 0.05$ vs. control group; ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. free fatty acid group.

reductase과 같은 콜레스테롤 합성에 관여하는 인자의 발현 조절 및 간 조직 내 콜레스테롤 유입을 유도한다는 연구 결과들에 의해 지방생성과 관련된 주요 인자로 작용한다는 것이 증명되었으며[7], 다양한 천연물들이 SREBP 경로 조절을 통해 간세포 내 지방 축적을 억제하는 연구가 보고되고 있다[8, 33]. 꾸지뽕 열매는 항비만 효과 및 비만 모델의 지방조직 내 ACC와 HMG-CoA reductase의 발현 억제에 대한 연구가 보고되어 있지만 간세포 내 SREBP 경로와 관련된 연구들은 알려진 바 없으며 인/줄기는 항비만 및 항당뇨 효과 및 관련 기작을 분석한 연구들이 보고되어 있다[15, 20].

꾸지뽕 열매 추출물의 간세포 내 지방축적 억제 효과는 앞의 결과들을 통해 확인하였으며, SREBP 경로 관련 인자들의

발현 변화를 확인하여 지방 축적 억제 기작을 분석하였다. FAS, SCD-1 등 지방합성 효소의 발현을 조절하는 전사 인자인 SREBP-1 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 꾸지뽕 열매 추출물 100, 300 µg/ml 농도로 처리하였을 때 유리지방산만 단독으로 처리한 군보다 SREBP-1의 발현량이 감소하였으며(Fig. 4A) SREBP-1에 의해 발현이 조절되는 FAS, SCD-1 발현도 꾸지뽕 열매 추출물 처리에 의해 억제됨을 확인하였다. 이는 꾸지뽕 열매 추출물이 지방산 및 중성지방 합성에 중요 인자인 SREBP-1 및 FAS, SCD-1의 발현을 억제함으로써 간 조직 내 지방축적을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 콜레스테롤 합성에 관여하는 HMG-CoA reductase의 발현을 조절하는 전사인자인 SREBP-2의 발현에 미치는 영향을 확인한 결

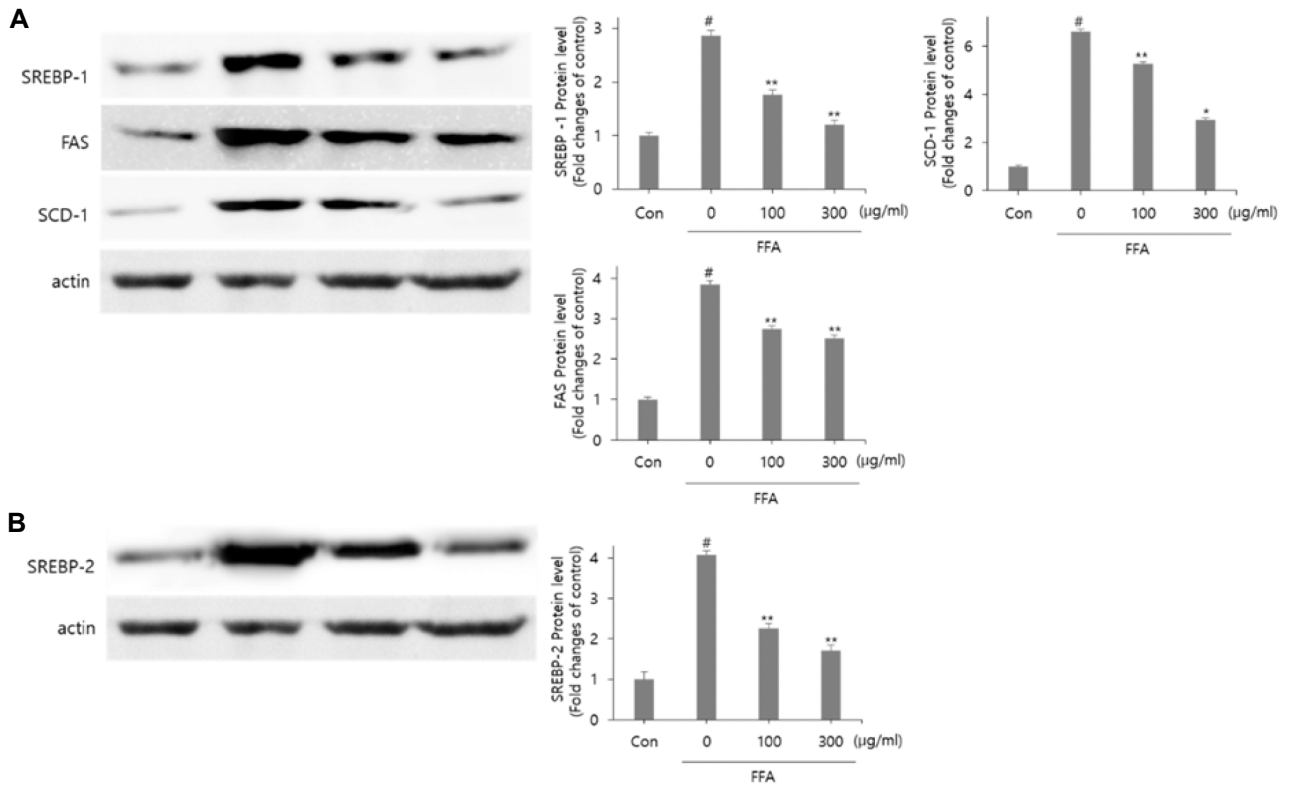


Fig. 4. Effects of *Cudrania tricuspidata* fruit extract on lipogenesis related protein expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of extract in the absence or presence of FFA for 24 hr. (A) SREBP-1, FAS and SCD-1 and (B) SREBP-2 protein expression was measured by Western blot analysis. Expression levels were normalized to β -actin expression level. The data presented are the means \pm S.E.M. of three independent experiments. # $p < 0.05$ vs. control group; ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. free fatty acid group.

과, 꾸지뽕 열매 추출물 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때, 유리지방산만 단독으로 처리한 군보다 SREBP-2의 발현량이 감소하였다(Fig. 4B). 이는 꾸지뽕 열매 추출물이 콜레스테롤 유입 및 합성에 중요 인자인 SREBP-2의 발현을 억제함으로써 간 조직 내 콜레스테롤 축적을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

지방 축적과 관련된 유전자 발현 결과를 통해서 꾸지뽕 열매 추출물이 중성지방 및 콜레스테롤 합성에 관여하는 SREBP 경로의 발현을 억제함으로써 간세포 내 지방 축적 억제 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

꾸지뽕 열매 추출물이 AMPK 활성화에 미치는 영향

AMPK는 에너지 대사과정과 지질 대사과정 조절에서 중요한 역할을 하는 인자로 AMPK의 phosphorylation에 의한 활성화가 SREBPs의 발현 억제를 통해 지방 축적을 억제시킴을 다양한 천연물을 이용한 연구를 통해서 보고되었다[1, 8, 33, 36, 40]. 유리지방산과 꾸지뽕 열매 추출물 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 AMPK의 활성화 여부를 확인하기 위해 pAMPK/AMPK의 발현 변화를 분석하였다. 그 결과, 꾸지뽕 추출물 처리에 의해 유리지방산만 단독으로 처리한 군보다

AMPK의 phosphorylation을 활성화를 증가시킴을 확인하였다(Fig. 5).

꾸지뽕 열매 추출물의 지방 축적 억제 기전을 분석하기 위해 AMPK/SREBP 신호전달 과정과 관련된 단백질의 발현 변화를 확인한 결과, 유리 지방산만 단독으로 처리한 군과 비교하였을 때 꾸지뽕 열매 추출물이 처리된 군에서는 AMPK의 활성화 증가 및 SREBP-1, FAS, SCD-1, SREBP-2의 발현이 억제되었으며, 이와 마찬가지로 콜레스테롤과 중성지방의 생성을 억제하였다. 이전 연구들을 통해서 AMPK는 SREBP-1와 SREBP-2의 발현을 억제하며, 이로 인해 간 조직 내에 지방산, 중성지방, 콜레스테롤 합성을 억제한다는 것이 보고되었다. 간 조직 내 지방 생성은 SREBP-1에 의해 주로 조절되는데 이는 지방 합성에 주요 조절인자로 중성지방 합성에 관여하는 FAS, SCD-1과 같은 유전자의 발현을 조절하며 SREBP-1의 감소는 FAS, SCD-1의 발현을 감소시키며 간 조직 내 지방 축적을 완화하였다[1, 35, 40]. 또한 SREBP-2는 HMG-CoA reductase의 발현을 조절하며 콜레스테롤 합성에 관여하며, 오미자를 투여한 고지혈증 실험 동물 모델을 통해서 SREBP-2와 HMG-CoA reductase의 발현이 감소하면 콜레스테롤의 생성이 감소한다는 것이 보고되었다[37]. 이러한 연구들은 AMPK/

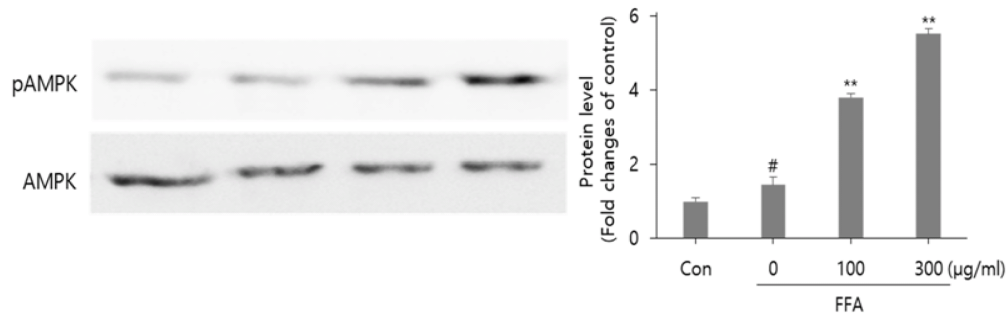


Fig. 5. Effects of *Cudrania tricuspidata* fruit extract on AMPK phosphorylation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of extract in the absence or presence of FFA for 24 hr. AMPK phosphorylation was detected by western blot analysis. The data presented are the means \pm S.E.M. of three independent experiments. # $p < 0.05$ vs. control group; ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. free fatty acid group.

SREBP 신호전달 과정과 관련된 단백질의 발현이 콜레스테롤과 중성지방 생성과 관련되어 있다는 것을 의미하며 꾸지뽕 열매 추출물의 결과와 부합하는 것으로 판단된다.

본 연구 결과를 통해 꾸지뽕 열매 추출물이 AMPK/SREBP 신호전달 경로를 조절하며 HepG2 세포의 지방 축적 억제 활성을 나타냄을 확인하였으며 결과적으로 NAFLD의 예방 및 개선을 위한 천연물 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 광주대학교 대학 연구비의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Angeles, T. S. and Hudkins, R. L. 2016. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert. Opin. Drug Discov.* **11**, 1187-1199.
- Beaton, M. D. 2012. Current treatment options for non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Can. J. Gastroenterol.* **26**, 353-357.
- Bahmani, M., Eftekhari, Z., Saki, K., Fazeli-Moghadam, E., Jelodari, M. and Rafieian-Kopaei, M. 2016. Obesity phytotherapy: Review of native herbs used in traditional medicine for obesity. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* **21**, 228-234.
- Bahmani, M., Mirhoseini, M., Shirzad, H., Sedighi, M., Shahinfard, N. and Rafieian-Kopaei, M. 2015. A review on promising natural agents effective on hyperlipidemia. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* **20**, 228-238.
- Birkenfeld, A. L. and Shulman, G. I. 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology* **59**, 713-723.
- Brouwers, B., Hesselink, M. K., Schrauwen, P. and Schrauwen-Hinderling, V. B. 2016. Effects of exercise training on intrahepatic lipid content in humans. *Diabetologia* **59**, 2068-2079.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331-340.
- Chang, J. J., Hsu, M. J., Huang, H. P., Chung, D. J., Chang, Y. C. and Wang, C. J. 2013. Mulberry anthocyanins inhibit oleic acid induced lipid accumulation by reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6069-6076.
- Choi, S. R., You, D. H., Jang, I., Ahn, M. S., Song, E. J., Seo, S. Y., Choi, M. K., Kim, Y. S., Kim, M. K. and Choi, D. G. 2012. Cytotoxicity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **20**, 153-158.
- Cohen, J. C., Horton, J. D. and Hobbs, H. H. 2011. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332**, 1519-1523.
- Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q. M. and Day, C. P. 2016. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. *Annu. Rev. Pathol.* **11**, 451-496.
- Jang, E., Shin, M. H., Kim, K. S., Kim, Y., Na, Y. C., Woo, H. J., Kim, Y., Lee, J. H. and Jang, H. J. 2014. Anti-lipoapoptotic effect of *Artemisia capillaris* extract on free fatty acids-induced HepG2 cells. *BMC. Complement. Altern. Med.* **14**, 253.
- Jang, I. M. 2003. Treatise on asian herbal medicines. Haksul-pyunsukwan in research institute of natural products of Seoul national university, Seoul, Korea.
- Jeon, J. H. and Park, K. G. 2014. Definition, pathogenesis, and natural progress of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Kor. Diabetes* **15**, 65-70.
- Jo, Y. H., Choi, K. M., Liu, Q., Kim, S. B., Ji, H. J., Kim, M., Shin, S. K., Do, S. G., Shin, E., Jung, G., Yoo, H. S., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. 2015. Anti-obesity effect of 6,8-Diprenylgenistein, an isoflavonoid of *Cudrania tricuspidata* fruits in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients* **7**, 10480-10490.
- Jo, Y. H., Kim, S. B., Ahn, J. H., Turk, A., Kwon, E. B., Kim, M. O., Hwang, B. Y. and Lee, K. 2019. Xanthones from the stems of *Cudrania tricuspidata* and their inhibitory effects on pancreatic lipase and fat accumulation. *Bioorg. Chem.* **92**, 10480-10490.

- 103234.
17. Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Do, S. G., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. 2017. Comparison of pancreatic lipase inhibitory isoflavonoids from unripe and ripe fruits of *Cudrania tricuspidata*. *PLoS One* **12**, e0172069.
 18. Kim, E. Y. and Lee, J. H. 2014. The effect of *Alisma orientale* extract on free fatty acid-induced lipoapoptosis in HepG2 cells. *J. Int. Kor. Med.* **35**, 184-194.
 19. Kim, O. K., Jun, W. and Lee, J. 2016. Effect of *Cudrania tricuspidata* and kaempferol in endoplasmic reticulum Stress-induced inflammation and hepatic insulin resistance in HepG2 Cells. *Nutrients* **8**, 60.
 20. Kim, O. K., Nam, D. E., Jun, W. and Lee, J. 2015. *Cudrania tricuspidata* water extract improved obesity-induced hepatic insulin resistance in db/db mice by suppressing ER stress and inflammation. *Food Nutr. Res.* **59**, 29165.
 21. Kim, Y. S., Lee, Y., Kim, J., Sohn, E., Kim, C. S., Lee, Y. M., Jo, K., Shin, S., Song, Y., Kim, J. H. and Kim, J. S. 2012. Inhibitory activities of *Cudrania tricuspidata* leaves on pancreatic lipase *in vitro* and lipolysis *in vivo*. *Evid. Base Compl. Alternative Med.* **2012**, 878365.
 22. Lee, C. B. 1985. *Dehanshikmuldogam* (A field guide to Korean plants). pp. 285, Hyangmoonsha, Seoul, Korea.
 23. Lee, S. J., Lee, M. J., Ko, Y. J., Choi, H. R., Jeong, J. T., Choi, K. Y., Cha, J. D., Hwang, S. M., Jung, H. K., Park, J. H. and Lee, T. B. 2013. Effects of extracts of unripe black raspberry and red ginseng on cholesterol synthesis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 628-635.
 24. Lin, C. L., Huang, H. C. and Lin, J. K. 2007. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells, *J. Lipid Res.* **48**, 2334-2343.
 25. Liu, Y., Wang, D., Zhang, D., Lv, Y., Wei, Y., Wu, W., Zhou, F., Tang, M., Mao, T., Li, M. and Ji, B. 2011. Inhibitory effect of blueberry polyphenolic compounds on oleic acid-induced hepatic steatosis *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 12254-12263.
 26. Misra, P. 2008. AMP activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 91-100.
 27. Mohandas, J., Marshall, J. J., Duggin, G. G., Horvath, J. S. and Tiller, D. J. 1984. Differential distribution of glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1801-1807.
 28. Musi, N. 2006. AMP-activated protein kinase and type 2 diabetes. *Curr. Med. Chem.* **13**, 583-589.
 29. Musso, G., Gambino, R. and Cassader, M. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog. Lipid Res.* **48**, 1-26.
 30. Ou, T. T., Hsu, M. J., Chan, K. C., Huang, C. N., Ho, H. H. and Wang, C. J. 2011. Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 2740-2748.
 31. Parekh, S. and Anania, F. A. 2007. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **132**, 2191-2207.
 32. Park, J. K. 2018. Antithrombotic and antiadipogenic effects of *Cudrania tricuspidata* fruit extract. Ph.D. dissertation, Kyung Hee University, Seoul, Korea.
 33. Park, M., Yoo, J. H., Lee, Y. S. and Lee, H. J. 2019. *Lonicera caerulea* extract attenuates non-alcoholic fatty liver disease in free fatty acid-induced HepG2 hepatocytes and in high fat diet-fed mice. *Nutrients* **11**, 494.
 34. Jeon, J. H. and Park, K. G. 2014. Definition, pathogenesis, and natural progress of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Kor. Diabetes.* **15**, 65-70.
 35. Reccia, I., Kumar, J., Akladios, C., Virdis, F., Pai, M., Habib, N. and Spalding, D. 2017. Nonalcoholic fatty liver disease: a sign of systemic disease. *Metab. Clin. Exp.* **72**, 94-108.
 36. Smith, B. K., Marcinko, K., Desjardins, E. M., Lally, J. S., Ford, R. J. and Steinberg, G. R. 2016. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **311**, 730-740.
 37. Sun, J. H., Liu, X., Cong L. X., Li, h., Zhang, C. Y., Chen, J. G. and Wang, C. M. 2017. Metabolomics study of the therapeutic mechanism of *Schisandra Chinensis* lignans in diet-induced hyperlipidemia mice. *Lipids Health Dis.* **16**, 145.
 38. Thounaojam, M. C., Jadeja, R. N., Dandekar, D. S., Devkar, R. V. and Ramachandran, A. V. 2012. *Sida rhomboidea*. Roxb extract alleviates pathophysiological changes in experimental *in vivo* and *in vitro* models of high fat diet/fatty acid induced non-alcoholic steatohepatitis. *Exp. Toxicol. Pathol.* **64**, 217-224.
 39. Vuppalanchi, R. and Chalasani, N., 2009. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* **49**, 306-317.
 40. Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J. and Sul, H. S. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 678-689.
 41. Yang, G., Lee, K., Lee, M., Ham, I. and Choi, H. Y. 2012. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production by chloroform fraction of *Cudrania tricuspidata* in RAW 264.7 macrophages. *BMC Compl. Altern. Med.* **12**, 250.
 42. Ziamajidi, N., Khaghani, S., Hassanzadeh, G., Vardasbi, S., Ahmadian, S., Nowrouzi, A., Ghaffari, A. M. and Abdirad, A. 2013. Amelioration by chicory seed extract of diabetes-and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPAR α and SREBP-1. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 198-209.

초록 : 유리지방산으로 지방축적을 유도한 HepG2 cells 대한 꾸지뽕 열매 추출물의 개선 효과

이효정 · 박세은 · 김승*

(광주대학교 식품생명과학과)

비알코올성 지방간은 만성 간 질환으로 비만, 고혈압, 비만, 이상지질혈증과 같은 다양한 대사증후군과 연관되어 있다. 꾸지뽕은 한국을 포함한 동아시아 국가에서 다양한 질병에 사용되는 약용작물로 본 연구에서는 유리지방산에 의해 지방축적이 유도된 세포 내에서 꾸지뽕 열매 추출물의 비알코올성 지방간 개선 효과와 기전을 규명하였다. 꾸지뽕 열매 추출물은 지방 축적 및 중성지방, 콜레스테롤 생성 및 HMG 환원효소의 활성을 억제하였다. 또한 지방생성과 관련된 유전자인 SREBP-1, FAS, SCD-1, SREBP-2의 발현을 억제 하였으며 AMPK의 활성화를 억제하였다. 본 연구결과를 통해서 꾸지뽕 열매 추출물이 유리지방산에 의해 유도된 지방 축적을 억제하고 AMPK/SREBP 신호전달 경로를 조절하여 억제 활성을 나타냄을 밝히며, 비알코올성 지방간의 예방 및 개선을 위한 천연물 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.