



Original Article / 원저

간 실질세포주에서 泥胡菜 분획물이 liver X receptor α 의존적 지방 생성 유전자의 발현에 미치는 효과

김재광^{1,2#}, 조일제^{1#}, 김은옥¹, 정대화^{1,3}, 구세광^{1*}, 김상찬^{1**}

¹대구한의대학교 한의과대학; ²한의학연구원 한의기술응용센터; ³디앤비바이오

The effects of *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge) fractionated extract on liver X receptor α -dependent lipogenic genes in hepatocyte-derived cells

Jae Kwang Kim^{1,2#}, Il Je Cho^{1#}, Eun Ok Kim¹, Dae Hwa Jung^{1,3},
Sae Kwang Ku^{1*}, Sang Chan Kim^{1**}

¹College of Korean Medicine, Daegu Haany University
²Korean Medicine–Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine
³D&B Bio

ABSTRACT

Objectives : *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge) is a wild herb that has been used for managing fever and wound in Korean Traditional Medicine. The present study explored the effects of *H. lyrata* extract on liver X receptor (LXR) α -dependent lipogenic genes in hepatocyte-derived cells.

Methods : After HepG2 cells or Huh7 cells were pre-treated with 1-10 μ g/mL of *H. lyrata* extract or its fractionated extract for 0.5 h, the cells were subsequently exposed to LXR ligand for 6-24 h. Cell viability, LXR response element (LXRE)-driven luciferase activity, sterol regulatory element binding protein-response element (SREBP-RE)-driven luciferase activity, SREBP-1c expression, and mRNA levels of *LXR α* and its-dependent target genes were determined. In addition, LC-MS/MS analysis was conducted to explore major compounds in *H. lyrata*-chloroform fractionated extract #4 (HL-CF4).

Results : Of various *H. lyrata* extracts tested, chloroform extract and its fractionated extract #4, HL-CF4, significantly decreased T0901317-mediated SREBP-1c expression. In addition, HL-CF4 significantly reduced LXRE

transactivation and *LXRα* mRNA expression without any cytotoxicity. Moreover, HL-CF4 prevented the SREBP-RE-driven luciferase activity and mRNA levels of fatty acid synthase and stearyl-CoA desaturase-1 induced by T0901317. Results from LC-MS/MS analysis at positive/negative mode indicated that HL-CF4 contained several compounds showing *m/z* 197.1176 ($C_{11}H_{17}O_3$), 693.2913/227.1069 ($C_{38}H_{45}O_{12}/C_{15}H_{15}O_2$), 203.1797 ($C_{15}H_{23}$), 181.1225 ($C_{11}H_{17}O_2$), 591.2957 ($C_{35}H_{43}O_8$), 379.1040 ($C_{18}H_{19}O_9$), 409.1509 ($C_{20}H_{25}O_9$), 309.1348 ($C_{16}H_{21}O_6$), 391.1404 ($C_{20}H_{23}O_8$), and 669.2924/389.1248 ($C_{36}H_{45}O_{12}/C_{20}H_{21}O_8$).

Conclusion : Based on its inhibition of the *LXRα*-dependent signaling pathway, *H. lyrata* chloroform extract and HL-CF4 have prophylactic potentials for managing non-alcoholic fatty liver.

Key words : *Hemistepta lyrata* chloroform fractionated extract, Hepatocyte-derived cell, Liver X receptor (*LXR*) α , Non-alcoholic fatty liver, T0901317.

I. 서론

비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver)은 서구화된 식습관에 따른 고열량 음식물의 과잉 섭취와 운동 부족 등의 원인으로 간 조직 내 5% 이상의 지방이 축적된 상태로써 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 유병률이 꾸준히 증가하고 있는 질환 중 하나이다^{1,2)}. 단순 비알코올성 지방간은 가역적 질환으로써 인체에 끼치는 영향이 상대적으로 작아 비교적 경증의 질환 중 하나로 인식되어 왔으나, 지속적인 지방간은 비알코올성 간염을 거쳐 간섬유화, 간경화 및 간암 등의 만성 간질환으로 이행될 수 있다¹⁾. 특히 적절한 치료제가 존재하는 않는 이들 만성 간질환들을 제어하기 위해서는 질병 초기를 표적으로 지방 축적 및 이를 통한 세포 손상과 염증 반응을 제어할 수 있는 적극적인 치료제의 발굴이 시급히 요구된다.

Liver X receptor (*LXR*)은 간 실질세포에서 지방 생성 (*de novo* lipogenesis)과 콜레스테롤 대사를 관장하는 핵수용체 (nuclear receptor)의 하나로써 포유류의 경우 *LXRα*와 *LXRβ*의 두 아형 (isoform)이 보고되었다³⁾. *LXRβ*는 거의 모든 조직에서 발현되는 반면에, *LXRα*는 대사적으로 활성화된 조직과 세포 (예, 간, 신장, 장, 지방조직 및 대식세포)에서 주로

발현된다⁴⁾. Ahn 등 (2014)은 비알코올성 지방간 환자의 중증도와 간 조직 중 *LXRα* 발현량이 밀접한 상관관계가 있음을 보고하였으며⁵⁾, Zhang 등 (2012)은 *LXRα*가 선택적으로 결손된 실험동물에서 *LXR* 리간드 (ligand)인 T0901317에 의한 혈액 내 중성지방의 증가가 억제됨을 보고하였다⁶⁾. 따라서 이들 연구결과는 간 조직 내에서 발현되는 두 *LXR* 아형 단백질 중 *LXRα*가 지방산 및 중성지방 합성과 비알코올성 지방간 질환의 유발에 관여하는 핵심 핵수용체임을 시사한다.

*LXRα*는 제 2형 핵수용체의 하나로써 리간드가 없는 상태에서 retinoid X receptor α 와 이형이량체 (heterodimer)를 형성하여 표적 유전자의 프로모터에 존재하는 두 개의 5'-AGGTCA-3' 사이에 4개의 비특이적 염기서열로 구분된 direct repeat 4 영역에 corepressor 단백질 복합체와 함께 결합되어 있다³⁾. 리간드의 결합은 *LXRα* 구조를 변형시켜 coactivator 단백질 복합체와의 결합을 유도하여 지방 생성을 조절하는 또 다른 핵심 전사인자인 sterol regulatory element binding protein-1c (*SREBP-1c*)의 전사를 촉진한다³⁾. 더불어 *LXRα*는 *SREBP-1c*와 함께 fatty acid synthase (*FASN*), stearyl-CoA desaturase-1 (*SCD-1*), acetyl-CoA carboxylase (*ACC*)를 포함한

#J. K. Kim and I. J. Cho contributed equally to this work.

*Corresponding author: Sae Kwang Ku, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-5149, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : gucci200@hanmail.net

**Corresponding author: Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : July 14, 2020 / Revised : August 13, 2020 / Accepted : August 18, 2020



다양한 지방 생성에 관여하는 단백질들의 발현을 유도한다^{3,7,8}). 따라서 LXR α 또는 LXR α /SREBP-1c 의존적 표적 유전자들의 발현 제어는 비알코올성 지방간 질환을 제어하는 주요한 약물 표적이며, 한의학에서도 LXR α /SREBP-1c 의존적 비알코올성 지방간 세포 모델을 활용하여 昆布⁹), 藿香, 金錢草¹⁰), 冬瓜子¹¹), 赤小豆¹²) 등의 藥材와 小分清飲¹³), 中滿分消丸¹⁴) 등의 方劑의 억제 효능이 연구되어 왔다.

泥胡菜 [*Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge); 일반명, 지칭개]는 국내 전역의 야산에서 자생하는 국화과의 두해살이 식물로써 민간에서 산나물로 식용되는 대표적인 산야초이다. 《貴州本草》에서는 清熱解毒, 祛癥生肌하는 효능이 있으며 骨折 또는 刺傷의 치료에 쥘어 바르며, 《救荒本草》에서는 痔漏, 疔瘡 등에 달여서 內服하거나 湯液으로 씻는다고 기록되어 있다^{15,16}). 그러나 泥胡菜的 생약으로써의 활용 가능성에 대한 문헌적 근거에도 불구하고 현재까지 泥胡菜를 本草, 方劑 및 임상 분야에서의 활용한 기록은 전무하다. 또한, 현대에 들어 泥胡菜 전초 및 꽃에 함유된 성분들에 대한 연구들이 진행된 이후에도 泥胡菜的 약리 효능을 객관적으로 규명하기 위한 관심과 연구는 상대적으로 부족하였다¹⁷⁻²¹). 따라서 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 泥胡菜 추출물이 lipopolysaccharide로 유도한 대식세포에서의 염증을 억제할 수 있음을 규명하였으며²²), 泥胡菜에 함유된 대표적 활성 성분인 hemistepsin A의 간염 및 간섬유화 억제 효능을 보고하였다^{23,24}). 더불어 Baek 등 (2020)은 hemistepsin A가 세포 및 동물 수준에서 간암세포의 성장을 지연시키고 세포자멸사를 유도하는 항암활성이 있음을 보고하였다²⁵). 따라서 泥胡菜는 다양한 급만성 간질환의 치료와 예방에 활용 가능성이 매우 높은 藥材로써 비알코올성 지방간 질환에 있어서도 효능이 있을 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 부족하였다.

따라서 본 연구에서는 비알코올성 지방간 세포 모델에서 泥胡菜 조추출물 (crude extract) 및 분획물 (fractionated extract)이 LXR α 의존적 지방 생성 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하여 신규 급만성 간질환 분야에서의 泥胡菜的 효용성을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 泥胡菜 분획물의 제조

경북 경산시 유곡동 인근 야산에서 자생하는 泥胡菜를 채취하여 음건하였으며, 건조한 泥胡菜 50 g에 500 mL의 용매를 가한 후 선행 방법에 따라 추출, 여과, 농축 및 건조의 과정을 거쳐 4종의 조추출물, HL-W (*H. lyrata* water extract), HL-E (*H. lyrata* ethanol extract), HL-M (*H. lyrata* methanol extract) 및 HL-C (*H. lyrata* chloroform extract)를 각각 제조하였다²⁴). HL-C (100 g)는 silica gel이 충전된 column (12 × 20 cm)을 이용하여 클로로포름 : 메탄올 = 100 : 0에서 0 : 100까지 메탄올의 비율을 점진적으로 증가시키며 용출하여 80개 (각 200 mL)의 분획을 얻었다. 80개의 분획은 thin layer chromatography (Merk Millipore, Billerica, MA, USA)에서의 분리 패턴에 따라 총 12개의 분획으로 구분하여 여과 (Whatman No.2 filter paper; Nalgene, New York, NY, USA), 농축 (EYELA, Tokyo, Japan) 및 동결건조 (Labconco, Kansas, MO, USA)를 수행하여 泥胡菜 클로로포름 분획물 (HL-CF; *H. lyrata* chloroform fractionated extract)을 제조하였다. HL-W, HL-E, HL-M 및 HL-C의 수율은 각각 43.3, 22.3, 33.5 및 5.3%였으며²⁴), HL-CF1에서 HL-CF12까지의 수율은 각각 1.2, 2.3, 5.4, 4.7, 10.9, 5.9, 15.8, 10.2, 7.8, 6.5, 5.8 및 8.2%였다. 제조한 泥胡菜 조추출물 및 클로로포름 분획물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 10 mg/mL의 농도로 용해한 후, -20°C에 보관하며 실험에 이용하였다.

2. 시약

T0901317은 Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA), SREBP-1 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), horseradish peroxidase가 결합한 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 각각 구입하였다. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), GW3965, β -actin 1차 항체와 기타 분석용 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 공급받았다.

3. 세포 배양 및 약물 처치

인체 유래 간 실질세포주인 HepG2 세포와 Huh7 세포는 American Type Culture Collection (Manassas,

VA, USA)과 한국세포주은행 (서울, 대한민국)에서 각각 분양받아 10% fetal bovine serum, 1× antibiotic-antimycotic solution (Gibco, Rockville, MD, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone Laboratories, Logan, USA)에서 배양하였다. 적절한 multi-well plate에 약 80% confluency로 배양된 세포는 serum을 포함하지 않는 세포 배양액으로 교환하여 10 µg/mL 泥胡菜 조추출물 또는 1-10 µg/mL 泥胡菜 chloroform 분획물을 30분 동안 전처리한 후 10 µM T0901317 또는 3 µM GW3965를 12-24 시간 동안 처리하였다. 대조세포는 동일 부피의 DMSO를 처리하였다.

4. Western blot 분석

처치가 완료된 세포로부터 전세포 단백질 추출액 (whole cell protein lysate)의 제조, 단백질 정량, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, polyvinylidene fluoride 막으로의 단백질 blotting, 항체 결합 반응과 X-ray film에 대한 chemiluminescence 반응은 기확립된 실험 방법에 따라 수행되었다²²⁻²⁴. 단백질의 상대적 발현량은 Epson perfection V700 Photo Scanner (Epson, Nagano, Japan)와 ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 β-actin의 발현량으로 보정하여 산출하였다.

5. 세포 생존율 분석

처치가 완료된 HepG2 또는 Huh7 세포에서 배양액을 제거하고 0.5 mg/mL MTT 용액을 100 µL 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 세포에 침착된 formazan 결정을 DMSO로 용해하여 570 nm에서의 흡광도를 Synergy HTX Multi-Mode Plate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포 생존율은 대조세포의 흡광도에 대한 %로 계산하였다.

6. 리포터 유전자 분석

LXR response element (LXRE)와 SREBP response element (SREBP-RE)를 각각 포함하는 리포터 유전자 TK-CYP7a-LXRE(×3)-LUC과 pGL2-FAS 플라스미드는 조선대 기성환 교수 (광주, 대한민국)로부터 제공받았다. 리포터 유전자 분석을 위하여 300 ng의 LXRE 또는 SREBP-RE 리포터 플라스미드와 40 ng

의 pRL-SV (Promega, Madison, WI, USA) 플라스미드를 FuGENE HD transfection reagent (Promega)를 이용하여 6시간 동안 12-well plate에 배양된 HepG2 세포에 도입하였다. HL-CF4 (1-10 µg/mL)를 30분간 전처리한 후 T0901317 (10 µM) 또는 GW3965 (3 µM)를 18시간 처리하여 Dual-Luciferase Assay System (Promega)와 GloMax[®] 20/20 luminometer (Promega)로 luciferase 활성을 측정하였다. Firefly luciferase 활성은 *Renilla* luciferase 활성으로 보정하였다.

7. Real-time polymerase chain reaction (PCR) 분석

처치가 완료된 Huh7 세포로부터 total RNA의 분리, cDNA 합성 및 real-time PCR은 기확립된 실험 방법에 따라 수행하였다²². Real-time PCR 분석을 위하여 아래와 같은 염기서열을 포함하는 primer들을 바이오니아 (대전, 대한민국)에서 합성하였다: *LXRα* forward 5'-GATCGAGGTGATGCTTCTGGAG-3', backward 5'-CCCTGCTTTGGCAAAGTCTTC-3'; *FASN* forward 5'-GACATCGTCCATTCGTTTGTG-3', backward 5'-CGGATCACCTTCTTGAGCTCC-3'; *SCD-1* forward 5'-CCTCTACTTGGGAAGACGACATTCCG-3', backward 5'-GCAGCCGAGCTTTGTAAGAGCGGT-3'; *ACC* forward 5'-GCTGCTCGGATCACTAGTGAA-3', backward 5'-TTCTGCTATCAGTCTGTCCAG-3'; Glyceradehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) forward 5'-GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC-3', backward 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'. 각 유전자 mRNA 발현의 상대정량은 *GAPDH* mRNA의 발현량으로 보정하여 2^{-ΔΔCT}법으로 계산하였다²⁶.

8. LC-MS/MS 분석

HL-CF4를 methanol에 완전히 용해/여과하여 얻은 용액 1 µl와 50% acetonitrile/0.1% formic acid 용액 99 µl를 혼합한 후, 이 중 10 µl를 Kinetex C18 column (column size, 150 × 2.1 mm; pore size, 2.6 µm; Phenomenex, CA, USA)이 장착된 high-performance liquid chromatography (Dionex Ultimate 3000 UHPLC; Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 주입하였다. 이동상은 0.1% formic acid가 포함된 물 (Solvent A)과 0.1%



formic acid가 포함된 acetonitrile (Solvent B)의 gradient solution을 이용하였다. 용출 조건은 0.24 mL/min의 유속으로 초기 0.1분간 95 : 5 (Solvent A : Solvent B)로 유지하다가 5분까지 용매비를 5 : 95로 acetonitrile의 농도를 점진적으로 증가시킨 후 5 : 95의 용매비를 7분까지 유지하였다. Column 온도는 40°C로 설정하였다. 용출된 물질들은 연결된 mass spectrometer (Q-Exactive Focus Quadrupole-Orbitrap MS; Thermo Fischer Scientific Inc.)에 의하여 electrospray ionization되어 양이온/음이온 모드에서 mass to charge ratio (m/z) 100-1200 범위의 peak에 대한 질량 분석을 수행하였으며, capillary의 온도는 320°C로 설정하였다. 검출된 물질들의 원소 구성은 탄소 50개, 수소 100개, 산소 30개 이내로 제한하여 mass error가 가장 적은 원소 구성을 추정하였다.

9. 통계 분석

3회 이상의 반복실험 후 실험 결과는 mean \pm SD로 표기하였으며, 각 그룹간 통계적 유의성은 등분산 가정의 성립여부에 따라 일원배치 분산분석 (ANOVA) 또는 Welch's ANOVA를 수행한 후, Tukey's honestly significant difference test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 각 그룹간 통계적 유의성은 P 값이 0.05 미만을 기준으로 설정하였다.

III. 실험 결과

1. Huh7 세포에서 泥胡菜 조추출물 및 클로로포름 분획물이 T0901317에 의하여 유도된 SREBP-1c 발현에 미치는 영향

LXR 리간드인 T0901317은 간 실질세포에서 LXR α /SREBP-1c 신호 회로의 활성화를 통하여 지방 생성

을 증가시킨다^{3,4}. 泥胡菜가 지방 생성 억제 효능을 나타내는지 연구하기 위하여 우선 열수, 에탄올, 메탄올 및 클로로포름의 4종의 용매를 이용한 泥胡菜 조추출물을 제조하고, Huh7 세포에 10 μ g/mL의 농도로 4종의 조추출물을 각각 30분간 전처리한 후, T0901317 (10 μ M)을 12시간 처리하여 SREBP-1c 단백질의 발현을 확인하였다. 예상했던 바와 같이 Huh7 세포에서 T0901317의 처리는 SREBP-1c의 발현을 대조세포 대비 2.84 \pm 0.51배로 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (Figure 1A). 泥胡菜 열수 (HL-W), 에탄올 (HL-E), 메탄올 조추출물 (HL-M)의 전처리는 T0901317에 의하여 증가한 SREBP-1c의 발현을 억제하지 못하였지만, 泥胡菜 클로로포름 조추출물 (HL-C)의 전처리는 SREBP-1c의 발현을 대조세포 대비 1.54 \pm 0.30배로 T0901317 처리그룹의 SREBP-1c 발현과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Figure 1A).

다음으로 泥胡菜 클로로포름 조추출물 (HL-C) 내에 SREBP-1c 발현을 억제할 수 있는 유효 성분들이 함유된 주요 분획물을 탐색하기 위하여 메탄올의 농도를 순차적으로 증가시키며 12개의 분획물을 제조한 후, Huh7 세포에서 T0901317에 의하여 증가하는 SREBP-1c 단백질의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. 12개의 泥胡菜 클로로포름 분획물 중 HL-CF4, HL-CF5, HL-CF6, HL-CF7은 T0901317 (대조세포 대비 2.00 \pm 0.16배)에 의하여 증가하는 SREBP-1c의 발현을 대조세포 대비 각각 0.61 \pm 0.19, 1.28 \pm 0.10, 0.92 \pm 0.20, 0.89 \pm 0.29배로 감소시켰으며, T0901317 처리그룹과 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 1B). HL-CF4에 의한 SREBP-1c 발현 억제가 가장 우수하였으므로 HL-CF4를 중심으로 후속연구를 수행하였다.

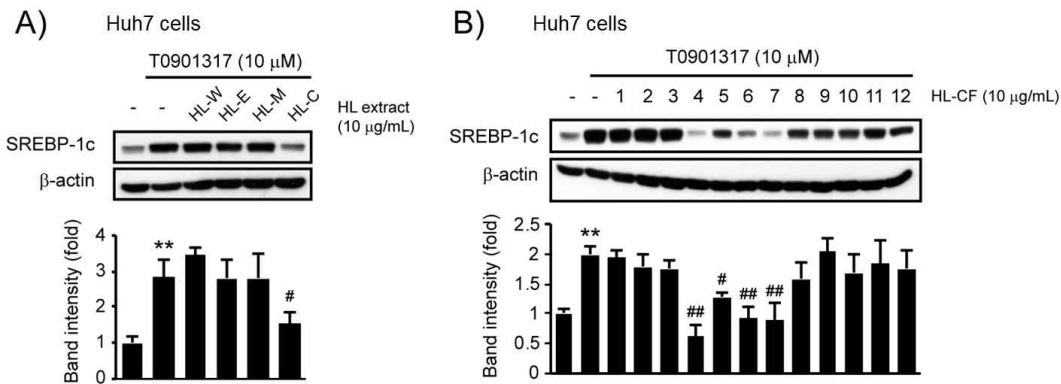


Figure 1. The effects of *H. lyrata* extracts on T0901317-mediated SREBP-1c induction in Huh7 cells. Huh7 cells were pretreated with 10 μg/mL *H. lyrata* crude extract (A) or its fractionated extract (B) for 0.5 h and subsequently exposed to 10 μM T0901317 for 12 h. Protein levels of SREBP-1c in whole cell lysates were determined using Western blot analysis and normalized by band intensity of β-actin. All values are expressed as mean ± SD (***P* < 0.01 between vehicle- and T0901317-treated cells; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 versus T0901317-treated cells). HL-W, *H. lyrata* water extract; HL-E, *H. lyrata* ethanol extract; HL-M, *H. lyrata* methanol extract; HL-C, *H. lyrata* chloroform extract; HL-CF, *H. lyrata* chloroform fractionated extract.

2. 泥胡菜 클로로포름 분획물, HL-CF4가 T0901317에 의한 LXRα 활성화에 미치는 영향

간 실질세포주에서 HL-CF4의 지방 생성 억제 효능 및 기전을 연구하기에 앞서 HL-CF의 처치 농도에 따른 세포생존율의 변화를 MTT assay로 확인하였다. 1-10 μg/mL의 HL-CF4를 30분간 전처리한 HepG2 또는 Huh7 세포에 10 μM T0901317을 24시간 동안 처치하였다. HepG2 세포에서 T0901317, T0901317 + 1 μg/mL HL-CF4, T0901317 + 3 μg/mL HL-CF4, T0901317 + 10 μg/mL HL-CF4, 10 μg/mL HL-CF4 처치에 의한 세포 생존율의 변화는 대조세포 (100.00 ± 2.15%)와 비교하여 각각 99.46 ± 2.29, 101.59 ± 3.91, 101.89 ± 3.03, 97.42 ± 3.16, 99.44 ± 1.93%였으며, 모든 처치 그룹간 세포 생존율의 유의적인 변화는 없었다 (Figure 2A, left). Huh7 세포에서 T0901317, T0901317 + 1 μg/mL HL-CF4, T0901317 + 3 μg/mL HL-CF4, T0901317 + 10 μg/mL HL-CF4, 10 μg/mL HL-CF4 처치에 의한 세포 생존율의 변화는 대조세포 (100.00 ± 2.73%)와 비교하여 각각

69.13 ± 5.46, 78.99 ± 7.58, 77.38 ± 5.16, 71.61 ± 3.91, 96.49 ± 4.39%였다. Huh7 세포에서 T0901317의 처치는 대조세포와 비교하여 세포 생존율을 통계적으로 유의하게 감소시켰으나, 1-3 μg/mL의 HL-CF4 전처치는 T0901317에 의한 세포 생존율의 감소를 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 10 μg/mL의 HL-CF4 전처치는 T0901317에 의한 세포 생존율의 감소를 변화시키지 못하였다. 더불어 10 μg/mL의 HL-CF4 단독 처치 그룹의 세포생존율은 대조세포와 비교하여 변화되지 않았다 (Figure 2A, right).

HL-CF4의 지질 생성 억제 기전을 연구하기 위하여 HepG2 세포에 LXRE에 의하여 조절되는 luciferase 유전자를 포함하는 플라스미드를 도입하여 리포터 유전자 분석을 수행하였다. 예상했던 바와 같이 T0901317의 처치는 LXRE 의존적 luciferase 활성을 대조세포 대비 9.87 ± 1.48배로 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (Figure 2B, left). 1 μg/mL의 HL-CF4 전처치는 T0901317에 의하여 증가한 luciferase 활성 (대조세포 대비 9.78 ± 1.12배)을

변화시키지 못하였으나, 3–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 전처치는 T0901317에 의하여 증가한 luciferase 활성을 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (T0901317 + 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, 6.80 ± 0.75 배; T0901317 + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, 4.73 ± 0.94 배). 대조세포와 비교하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 단독 처치는 luciferase 활성을 변화시키지 못하였다 (1.18 ± 0.38 배). 더불어 또 다른 LXR 리간드인 GW3965, GW3965 + 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, GW3965 + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4 처치 세포에서의 LXRE 의존적 luciferase 활성은 대조세포 대비 각각 7.04 ± 0.57 , 5.51 ± 0.57 , 3.44 ± 0.32 배였으며, 3–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 전처치에 의한 luciferase 활성 감소는 GW3965 처치세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 2B, right). T0901317은 LXR α 발현을 유도할 수 있음이 보고되

었다^{27,28}). 따라서 HL-CF4가 T0901317에 의하여 증가한 LXR α 발현 억제를 통하여 LXR α 활성을 제어하는지 연구하기 위하여 LXR α mRNA의 변화를 real-time PCR로 확인하였다. 선행 문헌 보고와 유사하게 Huh7 세포에 T0901317의 처치는 LXR α mRNA를 대조세포 대비 2.73 ± 0.15 배로 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 3–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 전처치는 T0901317에 의하여 증가한 LXR α mRNA를 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (T0901317 + 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, 1.58 ± 0.34 배; T0901317 + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, 0.88 ± 0.07 배). 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 단독 처치에 의한 LXR α mRNA (1.05 ± 0.50 배)는 대조세포의 LXR α mRNA의 발현과 대등하였다 (Figure 2C).

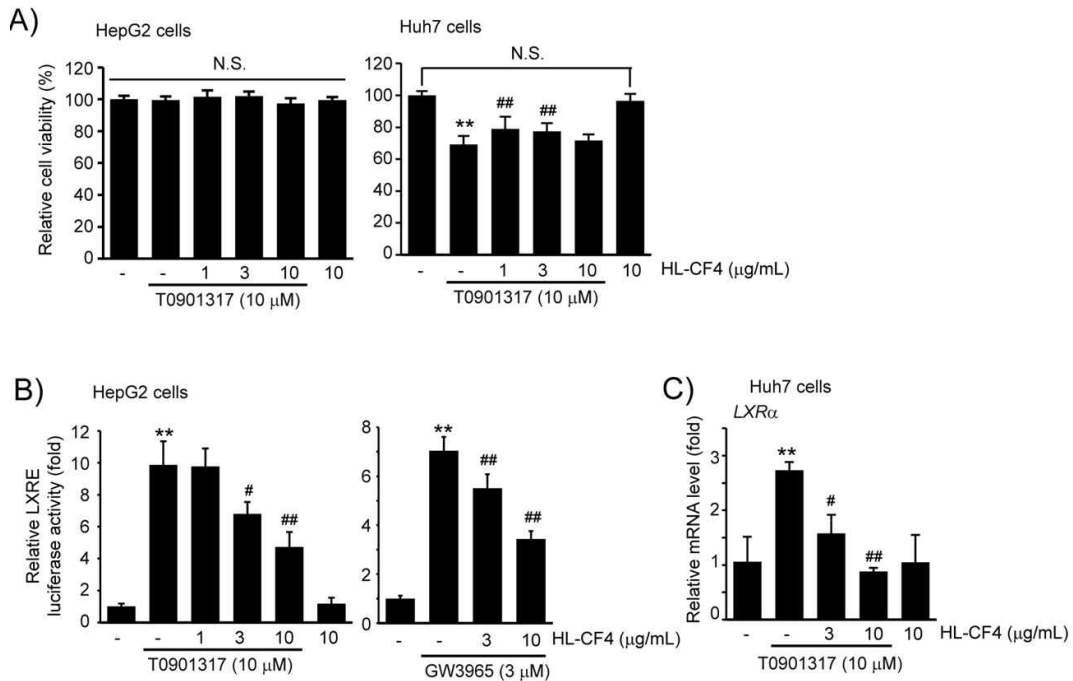


Figure 2. The effects of HL-CF4 on T0901317-mediated LXR α activation. (A) HepG2 (left) and Huh7 cells (right) were pretreated with 1–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4 for 0.5 h and subsequently exposed to 10 μM T0901317 for 24 h. Cell viability was determined using an MTT assay. (B) HepG2 cells were transiently transfected with LXRE reporter plasmid. Luciferase activities were determined after the transfected cells were treated with HL-CF4, T0901317, and GW3965, as described in methods section. (C) After treatment with HL-CF4 (0.5 h) and T0901317 (12 h), relative mRNA levels of LXR α were determined by real-time PCR. All values are expressed as mean \pm SD (** $P < 0.01$ between vehicle- and T0901317/GW3965-treated cells; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus T0901317/GW3965-treated cells). N.S., not significant.

3. 泥胡菜 클로로포름 분획물, HL-CF4가 LXR α 의 존적 지질 생성 유전자의 발현에 미치는 영향

HL-CF4의 농도 의존적 LXR α 활성 억제에 LXR α 하위 전사인자인 SREBP-1c 발현에도 영향을 미치는지 연구하기 위하여 3 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4가 전처리된 Huh7 세포에 T0901317을 12시간 동안 처리한 후 SREBP-1c 단백질의 발현을 Western blot으로 확인하였다. 대조세포와 비교하여 T0901317, T0901317 + 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, T0901317 + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4 처리에 의한 SREBP-1c의 발현은 각각 3.05 ± 0.43 , 2.35 ± 0.28 , 0.85 ± 0.51 , 0.31 ± 0.20 배였다. 3 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4가 전처리는 T0901317에 의하여 증가한 SREBP-1c의 발현을 감소시키는 경향을 나타내었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4 전처리에 의한 SREBP-1c 발현 감소는 T0901317 처리세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 3A).

HL-CF4가 SREBP-1c의 전사활성화에 미치는 영향을 연구하기 위하여 HepG2 세포에 SREBP-RE를 포함하는 리포터 플라스미드를 도입하여 리포터 유전자 분석을 수행하였다. T0901317의 처리는 SREBP-RE 의

존적 luciferase 활성을 3.87 ± 0.23 배 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 3-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 전처리는 T0901317에 의하여 증가한 luciferase 활성을 각각 3.08 ± 0.17 , 1.86 ± 0.09 배로 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Figure 3B). 더불어 Huh7 세포에서 12시간 동안의 T0901317 처리는 LXR α 와 SREBP-1c 표적 지방 생성 유전자인 *FASN*과 *SCD-1* mRNA를 각각 2.50 ± 0.34 , 2.79 ± 0.30 배 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 3-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HL-CF4 전처리는 T0901317에 의하여 증가한 *FASN*과 *SCD-1* mRNA를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. T0901317 + 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, T0901317 + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-CF4 처리에 의한 *FASN* mRNA 발현은 대조세포의 1.17 ± 0.13 , 0.83 ± 0.28 , 0.54 ± 0.11 배였으며, *SCD-1* mRNA 발현은 대조세포의 1.87 ± 0.46 , 0.80 ± 0.29 , 0.55 ± 0.07 배였다 (Figure 3C, left and middle). *ACC* mRNA의 경우 T0901317 및 HL-CF4의 처리에 의하여 다른 지질생성 유전자들과 유사한 발현의 변화를 나타내었으나, 통계적 유의성은 없었다 (Figure 3C, right).

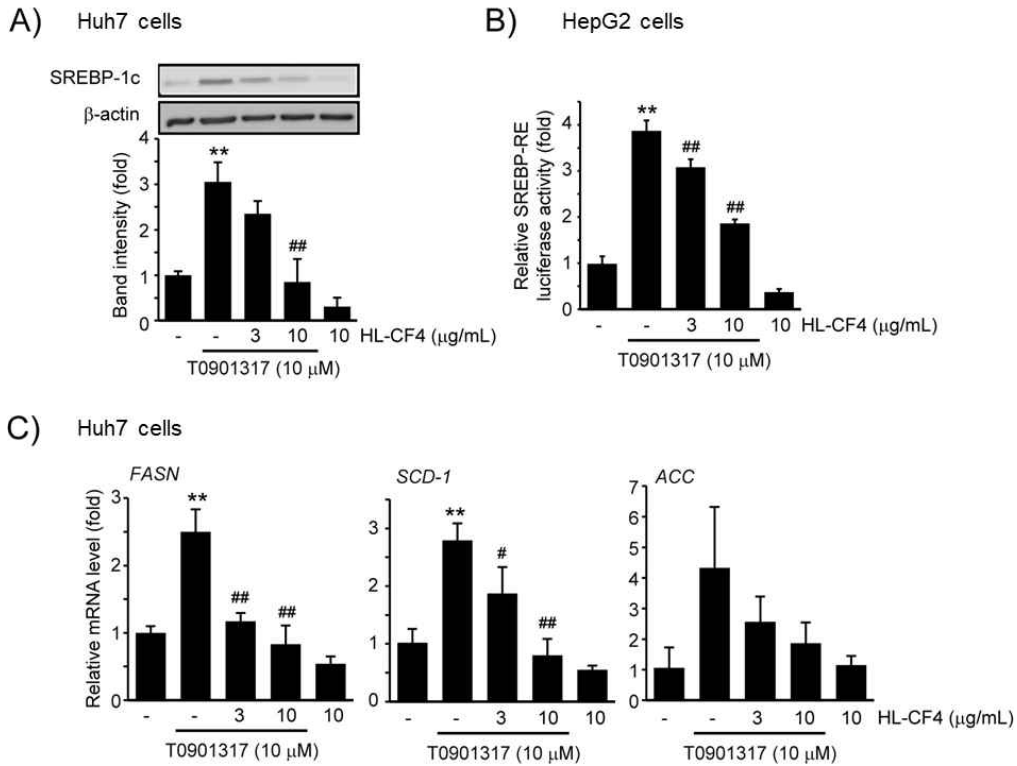


Figure 3. The effects of HL-CF4 on T0901317-mediated lipogenic genes expression. (A) Huh7 cells were pretreated with 3–10 $\mu\text{g/mL}$ HL-CF4 for 0.5 h and subsequently exposed to 10 μM T0901317 for 12 h. SREBP-1c expression was determined by Western blot analysis. (B) HepG2 cells which transfected with SREBP-RE reporter plasmid were treated with HL-CF4 and T0901317, as described in methods section. (C) After treatment with HL-CF4 (0.5 h) and T0901317 (12 h), relative mRNA levels of *FASN* (left), *SCD-1* (middle), and *ACC* (right) were determined by real-time PCR. All values are expressed as mean \pm SD (** P < 0.01 between vehicle- and T0901317-treated cells; # P < 0.05, ## P < 0.01 versus T0901317-treated cells).

4. 泥胡菜 클로로포름 분획물, HL-CF4의 LC-MS/MS 분석

HL-CF4에 포함된 주요 성분들을 추정하기 위하여 LC-MS/MS 분석을 수행하였다. HL-CF4에는 양이온화가 가능한 최소 12종 (base peak intensity normalization level = $1.37 \times E^9$)과 음이온화가 가능한 13종 이상의 성분 (base peak intensity normalization level = $2.80 \times E^8$)이 함유되어 있음을 HPLC chromatogram으로 확인하였으며, positive mode에서의 (b) 성분 함량이 가장 많았다 (Figure 4A). 각 모드에서 3분 이상의 머무름 시간을 가지는 대표 5종의 성분들을 m/z 100에서 1200 범위에서 full scan을 실시하여

주요 성분의 m/z 와 분해 산물의 m/z 패턴을 바탕으로 mass error가 적은 화학식을 추정하였다. Positive mode에서 분리된 대표적인 성분 (a), (b), (c), (d), (e)의 추정 분자량과 원소 구성은 각각 197.1176 ($C_{11}H_{17}O_3$), 693.2913/227.1069 ($C_{38}H_{45}O_{12}/C_{15}H_{15}O_2$), 203.1797 ($C_{15}H_{23}$), 181.1225 ($C_{11}H_{17}O_2$), 591.2957 ($C_{35}H_{43}O_8$)였으며, negative mode에서 분리된 대표적인 성분 (f), (g), (h), (i), (j)의 추정 분자량과 원소 구성은 각각 379.1040 ($C_{18}H_{19}O_9$), 409.1509 ($C_{20}H_{25}O_9$), 309.1348 ($C_{16}H_{21}O_6$), 391.1404 ($C_{20}H_{23}O_8$), 669.2924/389.1248 ($C_{36}H_{45}O_{12}/C_{20}H_{21}O_8$)였다 (Figure 4B).

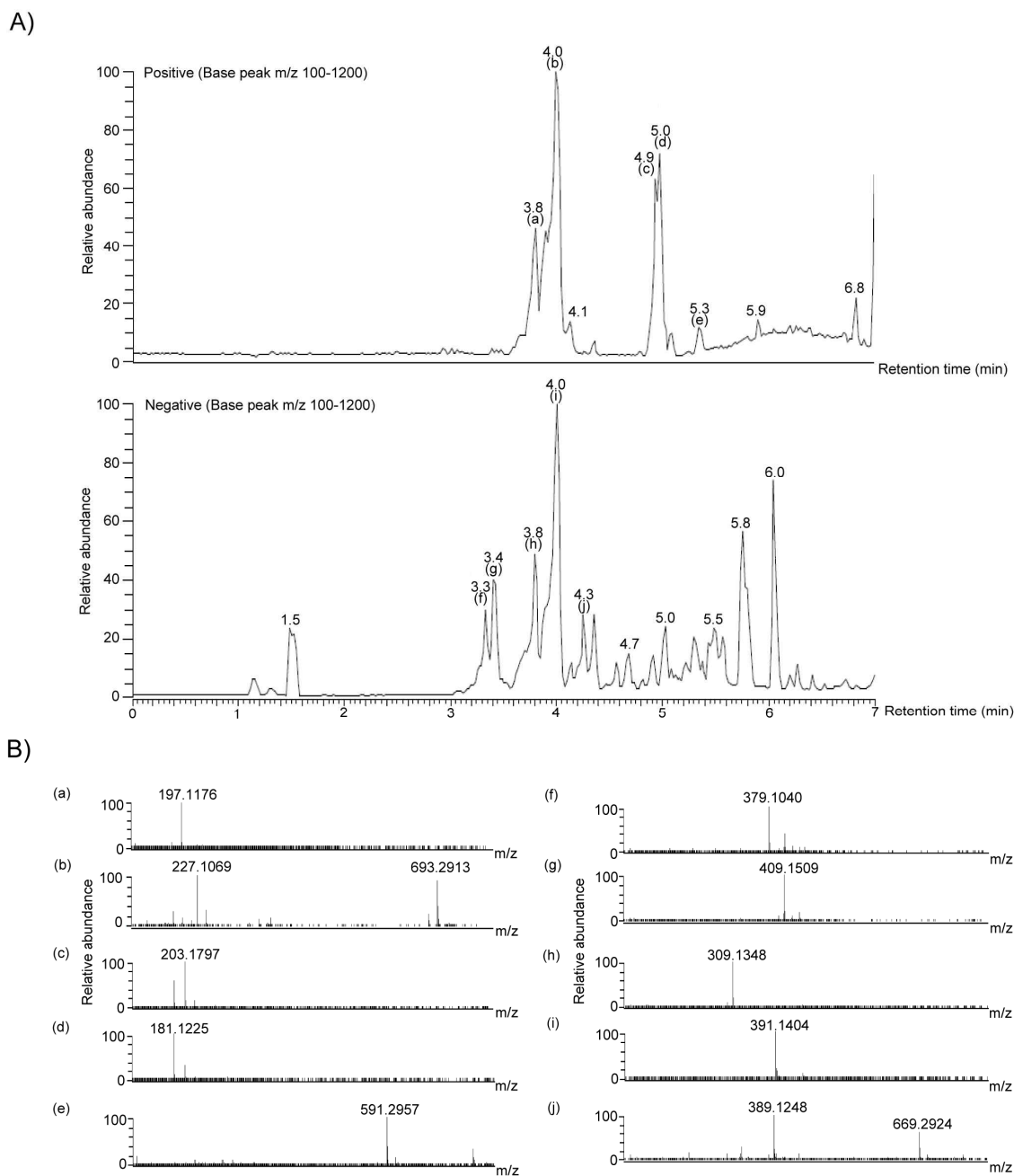


Figure 4. LC-MS/MS analysis of HL-CF4. (A) Representative HPLC chromatogram of HL-CF4 in positive (upper) and negative mode (lower). Base peak chromatogram represents the intensity of the most intense peak at every point in the analysis. Numbers in each peaks indicate the retention time. (B) Representative mass spectra of ten eluants in positive and negative mode. Numbers in each spectra indicate m/z value of major peaks.



IV. 고찰

SREBP는 LXR α 에 의하여 발현이 증가하는 핵심 전사인자이다⁴⁾. 지방 생성을 자극하는 세포 내외의 다양한 신호는 세포체 막에 결합된 SREBP 전구체 단백질을 골지체로 이동시키고, 골지체에 존재하는 단백질 가수분해 효소 (예, site-1 protease)들에 의하여 SREBP 단백질의 가수분해가 촉진되어 성숙한 SREBP를 핵으로 이동시켜 중성지방, 지방산 및 콜레스테롤 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 증가시킨다²⁹⁾. 인체에 발현되는 SREBP는 3종의 아형 단백질이 존재하며 이 중 SREBP-1c가 간 조직에서 지방 생합성에 관여하는 핵심 단백질임이 규명되었다^{29,30)}. 따라서 본 연구에서는 각 추출물의 전처치가 T0901317에 의하여 증가한 SREBP-1c 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot 분석을 일종의 검색 시스템으로 활용하였으며, 그 결과 4종의 泥胡菜 조추출물 중 클로로포름 조추출물 (HL-C)과 12종의 泥胡菜 클로로포름 분획물 중 HL-CF4, HL-CF5, HL-CF6, HL-CF7이 SREBP-1c 발현을 억제할 수 있는 효능이 있음을 확인하였다. 더불어 후속 연구를 통하여 HL-CF4가 LXR α 의존적 지방 생성 억제에 효과적인 泥胡菜 분획물임을 제시하였다.

T0901317은 LXR α 와 LXR β 에 동시에 결합할 수 있는 리간드일 뿐 아니라 farnesoid X receptor, pregnane X receptor와 같은 다른 핵수용체들을 활성화시킬 수 있는 리간드이다^{31,32)}. 그러나, 다양한 핵수용체 중 T0901317은 LXR α 에 대한 친화도가 가장 높은 것으로 보고되어³²⁾ 많은 연구에서 LXR α 의 세포 내 기능을 연구하기 위한 리간드로써 T0901317을 주로 사용하여 왔으며, 본 연구에서도 LXR α 의존적 지방 생성 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 T0901317을 이용하였다. 본 연구에서는 HL-CF4가 T0901317에 의하여 유도된 LXR α 의 활성화와 더불어 SREBP-1c, FASN, SCD-1과 같은 지방 생성 유전자들의 발현을 유의하게 억제할 수 있음을 규명하였다. 또한 본 연구에서는 HL-CF4가 다른 LXR 리간드인 GW3965에 의하여 증가한 LXRE 리포터 유전자 활성을 억제할 수 있음을 확인하여 HL-CF4에 의한 지방 생성 유전자 발현 억제 효과에 LXR α 의 활성 억제가 매개됨을 제시하였다.

LXR α 의존적 지방 생합성은 세포 내 다양한 신호 분자의 활성화에 의하여 억제될 수 있으며, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)와 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 대표적인 신호 분자로서 규명되었다^{33,34)}. Nrf2는 인체의 산화/환원 항상성을 유지하는 항산화 유전자의 발현을 조절하는 대표적인 전사인자로서 Nrf2의 유전적 결손은 메치오닌/폴린 결핍 식이에 의하여 유도된 지방 축적과 염증을 악화시킬 수 있음이 보고되어 간 조직 내 지방 축적의 억제에 있어 Nrf2의 활성화가 핵심적인 역할을 담당할 수 있음이 보고되었다^{34,35)}. 또한 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 대표적인 항산화 물질인 resveratrol이 Nrf2 의존적 sestrin-2의 유도를 통하여 T0901317에 의한 지방 생성을 억제할 수 있음을 보고하였으며^{36,37)}, 泥胡菜에 포함된 대표적 활성 성분인 hemistepsin A가 Nrf2의 활성화를 통하여 염증성 간질환을 억제할 수 있음을 보고하였다²⁴⁾. 또한 Baek 등 (2020)은 hemistepsin A가 AMPK의 활성화를 통하여 간암세포의 사멸을 촉진한다고 보고하였다²⁵⁾. AMPK의 활성화에 의한 지질 축적 억제는 AMPK가 LXR α , SREBP-1c, ACC의 인산화를 촉진하여 지방 생합성을 조절할 수 있음이 규명되었다^{8,33,38)}. 따라서 HL-CF4의 LXR α 의존적 지방 생성 유전자의 발현 억제 효능에 있어서도 AMPK와 Nrf2의 활성화가 관여할 가능성이 높으며, 이와 관련된 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Nugroho 등 (2013)은 泥胡菜 전초 메탄올 추출물에서 linarin을 포함한 13종의 flavonoid류와 caffeic acid 유도체가 함유되어 있음을 보고하였으며¹⁷⁾, Dong 등 (2014)은 전초 에탄올 추출물에서 6''-O-(2''-methylbutyryl)isowertisin를 포함한 6종의 acylated flavone C-glycoside 유도체를 분리하여 보고하였다¹⁸⁾. 또한 泥胡菜 클로로포름 추출물과 관련된 성분 연구로서는 Jang 등 (1998)이 전초로부터 sesquiterpene lactone 계열의 화합물인 hemistepsin A, hemistepsin B를 분리하여 보고하였으며²¹⁾, 꽃으로부터 isoamberboin, 8-hydroxyzaluzanin C와 3종의 acetylenic hydrocarbon 유도체가 함유되어 있음을 보고하였다^{19,20)}. 일반적으로 추출 용매에 따라 약재로부터 용출되는 성분들의 종류와 함량이 달라지게 된다. 이와 같은 사실에 기초하여 본 연구에서는 T0901317에 의한 SREBP-1c 단백질 발현의 억제 효

능이 가장 우수하였던 HL-CF4에 포함된 성분들을 추정하기 위하여 LC-MS/MS 분석을 수행하여 positive mode 및 negative mode에서 유리된 10종의 대표 화합물들에 대한 질량 분석을 통하여 HL-CF4에 함유된 화합물의 분자량과 개략적인 원소 구성을 추정하였다. 특히, HL-CF4에 가장 많이 함유된 (b) 화합물 및 분해 산물의 질량 분석 결과를 바탕으로 (b) 화합물이 hemistepsin A 또는 hemistepsin A의 유도체 (예, 이량체)인 것을 확인하였다. 이 결과는 4종의 泥胡菜 조추출물 중 클로로포름 추출물에 hemistepsin A를 가장 많이 함유하고 있음을 보고한 선행 연구의 결과와도 일치하며²⁴⁾, 이에 hemistepsin A가 비알코올성 지방간에 유효한 활성 성분 중 하나일 수 있음을 제시하기 위한 세포 및 동물 수준에서 후속 연구를 수행 중에 있다 (manuscript in preparation). 따라서 HL-CF4에 의한 LXR α 의존적 지방 생성 유전자 발현의 억제 효능은 HL-CF4에 함유된 hemistepsin A 또는 그 유도체가 주요 활성 성분으로써 기여하는 것으로 추정되며, hemistepsin A 이외의 유효 성분과 지표 성분들을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

간 실질세포주에서 泥胡菜 조추출물 및 클로로포름 분획물이 T0901317에 의한 LXR α 의존적 지방 생성 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 4종의 泥胡菜 조추출물 중 클로로포름 추출물만이 T0901317에 의하여 증가한 SREBP-1c의 발현을 억제하였다. 더불어 12종의 클로로포름 분획물 중에서는 HL-CF4, HL-CF5, HL-CF6, HL-CF7이 SREBP-1c의 발현을 억제하였으며, HL-CF4에 의한 SREBP-1c 발현 억제가 가장 우수하였다.
2. T0901317 및 1-10 $\mu\text{g/mL}$ HL-CF4 처치는 HepG2 세포의 생존율을 변화시키지 못하였다. Huh7 세포에서 1-3 $\mu\text{g/mL}$ HL-CF4의 전처치는 T0901317에 의하여 감소한 세포 생존율을 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ HL-CF4의 전처치는

T0901317에 의하여 감소한 세포 생존율을 변화시키지 못하였다. 3-10 $\mu\text{g/mL}$ HL-CF4의 전처치는 T0901317 및 GW3965에 의하여 증가하는 LXRE 리포터 유전자 활성 및 LXR α mRNA 발현을 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

3. HL-CF4는 전처치는 T0901317에 의하여 유도된 SREBP-1c 단백질 발현, SREBP-RE 리포터 유전자 활성, FASN mRNA 및 SCD-1 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.
4. LC-MS/MS 분석을 통하여 HL-CF4에 양이온화가 가능한 m/z 197.1176 ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_3$), 693.2913/227.1069 ($\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{O}_{12}/\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_2$), 203.1797 ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}$), 181.1225 ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_2$), 591.2957 ($\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{O}_8$)을 포함한 12종 이상의 성분과 음이온화가 가능한 m/z 379.1040 ($\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_9$), 409.1509 ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_9$), 309.1348 ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_6$), 391.1404 ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_8$), 669.2924/389.1248 ($\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{O}_{12}/\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8$)을 포함한 13종 이상의 성분이 있음을 확인하였다.

따라서 이상의 결과를 통하여 泥胡菜 클로로포름 분획물, HL-CF4가 간 실질세포에서 T0901317로 활성화된 LXR α 의존적 지방 생성 유전자의 발현을 억제할 수 있음을 규명하였다. HL-CF4에 포함된 주요 유효 성분을 도출하고 *in vivo* 효능을 검증하는 연구들을 포함한 다양한 후속 연구가 지속적으로 수행된다면 대사성 지방간 및 이에 의한 만성 간질환을 제어하기 위한 처방의 가미 또는 대체 약재로써 泥胡菜 또는 泥胡菜 클로로포름 분획물을 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 (2018R1A5A2025272, 2018R1A2B6007514)의 연구개발비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Ding L, Oligschlaeger Y, Shiri-Sverdlov R,



- Houben T. Nonalcoholic fatty liver disease; in Handbook of experimental pharmacology. Germany:Springer. 2020.
2. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic steatohepatitis: A review. JAMA. 2020;323:1175-83.
 3. Wang B, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. Nat Rev Endocrinol. 2018;14:452-63.
 4. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. Genes Dev. 2000;14:2819-30.
 5. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Dig Dis Sci. 2014;59:2975-82.
 6. Zhang Y, Breevoort SR, Angdisen J, Fu M, Schmidt DR, Holmstrom SR, et al. Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. J Clin Invest. 2012;122:1688-99.
 7. Zhang X, Liu J, Su W, Wu J, Wang C, Kong X, et al. Liver X receptor activation increases hepatic fatty acid desaturation by the induction of SCD1 expression through an LXR α -SREBP1c-dependent mechanism. J Diabetes. 2014;6:212-20.
 8. Hwang SH, Ki SH, Bae EJ, Kim HE, Kim SG. Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithioethiones. Hepatology 2009;49:1913-25.
 9. Kim SY, Kwon JN, Lee I, Hong JW, Choi JY, Park SH, et al. Research on anti-lipogenic effect and underlying mechanism of *Laminaria japonica* on experimental cellular model of non-alcoholic fatty liver disease. J Int Korean Med. 2014;35:175-83.
 10. Lee HI, Kim YK, Lim HC, Lee DE, Kim EJ, Moon YH. Effects of Agastachis Herba extract and Lysimachiae Herba extract on the experimental cellular model of NFLDs induced by palmitic acid. J Int Korean Med. 2018;39:302-12.
 11. Choi JY, Kim SY, Kwun MJ, Kim KH, Joo MS, Han CW. Effects of ethanol extract of Benincasa seeds on the experimental cellular model of nonalcoholic fatty liver disease. Korean J Orient Int Med. 2012;33:438-47.
 12. Jang YS, Seo JY, Kwun MJ, Kwon JN, Lee I, Hong JW, et al. Effect of *Phaseolus angularis* seed on experimental cellular model of nonalcoholic fatty liver disease. Korean J Orient Physiol Pathol. 2013;27:802-8.
 13. Lee HI, Kim JS, Kim CJ, Kim HN, Yang TJ, Jeong SJ, et al. Research on anti-lipogenic effect of *Sobuncheong-eum* on experimental cellular model of non-alcoholic fatty liver disease. Herbal Formular Sci. 2016;24:100-7.
 14. Lee JW, Choi CW, Jeon SY, Han CW, Ha YJ. Effect of *Jungmanbunso-hwan* extract on HepG2 cell model of nonalcoholic fatty liver disease caused by palmitate. J Int Korean Med. 2016;37:442-52.
 15. Kim CM, Shin MG, An DG, Lee KS. Unabridged Dictionary of Chinese Medicine. Seoul:Jungdam. 1997:1091-2.
 16. Jung BS, Shin MK. Encyclopedia of illustrated Korean natural drugs. 1st ed. Seoul:Yeong Lim Sa. 1990:1053-4.
 17. Nugroho A, Lim SC, Byeon JS, Choi JS, Park HJ. Simultaneous quantification and validation of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Hemistepta lyrata* and peroxynitrite-scavenging activity. J Pharm

- Biomed Anal. 2013;76:139-44.
18. Dong FY, Guan LN, Zhang YH, Cui ZH, Wang L, Wang W. Acylated flavone C-glycosides from *Hemistepta lyrata*. J Asian Nat Prod Res. 2010;12:776-80.
 19. Ha TJ, Jang DS, Lee KD, Lee JR, Park KH, Yang MS. Studies on the constituents from flowers of *Hemisteptia lyrata* (Bunge) (II). Kor J Pharmacogn. 2002;33:92-5.
 20. Ha TJ, Lee KD, Lee JR, Lee J, Park KH, Yang MS. Studies on the constituents from flowers of *Hemisteptia lyrata* (Bunge) (I). Kor J Pharmacogn. 2001;32:238-41.
 21. Jang DS, Yang MS, Park KH. Sesquiterpene lactone from *Hemisteptia lyrata*. Planta Med. 1998;64:289-90.
 22. Kim JK, Park SY, Choi HY, Jang MH, Jung DH, Kim SC, et al. Anti-inflammatory effect of *Hemistepta lyrata* Bunge (Bunge) on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. Herbal Formula Sci. 2019;27:7-16.
 23. Kim JK, Han NR, Park SM, Jegal KH, Jung JY, Jung EH, et al. Hemistepsin A alleviates liver fibrosis by inducing apoptosis of activated hepatic stellate cells via inhibition of nuclear factor- κ B and Akt. Food Chem Toxicol. 2020;135:111044.
 24. Kim JK, Lee JE, Jung EH, Jung JY, Jung DH, Ku SK, et al. Hemistepsin A ameliorates acute inflammation in macrophages via inhibition of nuclear factor- κ B and activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. Food Chem Toxicol. 2018;111:176-88.
 25. Baek SY, Hwang UW, Suk HY, Kim YW. Hemistepsin A inhibits cell proliferation and induces G0/G1-phase arrest, cellular senescence and apoptosis via the AMPK and p53/p21 signals in human hepatocellular carcinoma. Biomolecules 2020;10:713.
 26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 2001;25:402-8.
 27. Ma AZ, Song ZY, Zhang Q. Cholesterol efflux is LXR α isoform-dependent in human macrophages. BMC Cardiovasc Disord 2014;14:80.
 28. Endo-Umeda K, Uno S, Fujimori K, Naito Y, Saito K, Yamagishi K, et al. Differential expression and function of alternative splicing variants of human liver X receptor α . Mol Pharmacol. 2012;81:800-10.
 29. Moslehi A, Hamidi-zad Z. Role of SREBPs in liver diseases: A mini review. J Clin Transl Hepatol. 2018;6:332-8.
 30. Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Park EA, Raghov R, Elam MB. Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2002;290:256-62.
 31. Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. FEBS Lett. 2007;581:1721-6.
 32. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev. 2000;14:2831-8.
 33. Fullerton MD. AMP-activated protein kinase and its multifaceted regulation of hepatic metabolism. Curr Opin Lipidol. 2016;27:172-80.
 34. Jadeja RN, Upadhyay KK, Devkar RV, Khurana S. Naturally occurring Nrf2 activators: potential in treatment of liver injury. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:3453926.
 35. Sugimoto H, Okada K, Shoda J, Warabi E, Ishige K, Ueda T, et al. Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;298:G283-94.
 36. Jin SH, Yang JH, Shin BY, Seo K, Shin SM, Cho IJ, et al. Resveratrol inhibits LXR α -dependent hepatic lipogenesis through

- novel antioxidant Sestrin2 gene induction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;271:95-105.
37. Shin BY, Jin SH, Cho IJ, Ki SH. Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression. *Free Radic Biol Med.* 2012;53:834-41.
38. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2011;13:376-88.