

진귤(*Citrus sunki*) 과피추출물이 H4IIE 간세포 포도당합성에 미치는 영향

이영기, 박덕배

제주대학교 의학전문대학원 조직학교실

(Received November 19, 2013; Revised November 26, 2013; Accepted December 3, 2013)

Abstract

Effect of Extract of *Citrus Sunki* Peel on Gluconeogenesis in H4IIE Hepatoma Cells

Young-Ki Lee, Deok-Bae Park

Department of Histology, Jeju National University School of Medicine, 690-756 Jeju, Korea

Peel of *Citrus sunki* traditionally has a potential anti-inflammatory activity and traditionally has been used to alleviate respiratory symptoms in Jeju, Korea. However, little is known about the metabolic function of *Citrus sunki* peel. The present study investigated whether the extract of the fermented *Citrus sunki* peel might affect glucose production (gluconeogenesis) in H4IIE rat hepatoma cells. When H4IIE cells were incubated in glucose-free medium overnight, concentration of glucose in culture medium were elevated and treatment with ethanol extract of *Citrus sunki* peel (SE) significantly suppressed the glucose production. Protein levels of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) were also decreased by treatment with SE. Hesperidine and rutin, flavonoids present in SE, however, failed to suppress the glucose production. Addition of hydrogen peroxide decreased the viability of H4IIE cells. SE, hesperidin, rutin protected H4IIE cells against the cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. In summary, SE can suppress glucose production in glucose-deficient conditions and protect cells against oxidative stress. It should be further studied which compounds are responsible for the gluconeogenic activity of SE. (J Med Life Sci 2013;10(1):116-119)

Key Words : *Citrus sunki*, glucose production, H4IIE hepatoma cells

서론

제주도에서 재배되고 있는 감귤류는 20세기 초 일본으로부터 도입된 온주밀감류가 대부분이며, 그 외에 12종의 재래 감귤이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 이 중 진귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)의 과피를 건조시킨 것을 진피라 하여 한방에서는 없어서는 안될 필수적인 한약재로 사용하여 왔으나, 최근에는 일반 온주밀감의 건조과피 또한 진피로 불리어지고 있다. 진귤등의 재래감귤류와 온주밀감류는 모두 분류학상으로는 *Citrus* 속에 해당되며 최근 성분조사, 생리활성에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 특히 과피의 기능성에 대한 관심들이 집중되어 있는데 예를 들면 항암작용^{2,3)}, 항알러지효과 및 대식세포의 활성증대⁴⁾들과 같은 약리활성들이 보고된 바 있다. 그러나 전통적으로 대표적인 한약재로 사용 되어진 진귤의 과피, 즉 진피를 대상으로 한 연구결과는 아직 알려져 있지 않다. 본 연구자의 이

전 연구결과⁵⁾에 의하면 진귤과피를 건조, 발효시킨 추출물이 대식세포에서 산화질소의 생성을 억제하고 염증유발 단백질생성을 억제하였다. 또한 알콜분해활성을 높이며 고지방식이에 의한 간 조직내 지질축적을 억제하였다⁶⁾.

근육세포에서 포도당을 정상적으로 흡수하지 못하거나 간세포에서 포도당합성을 정상적으로 억제하지 못하면 혈중 포도당 농도가 높게 유지되며 이러한 현상은 인슐린저항성 또는 제2형 당뇨병의 병리학적 원인이 된다. 따라서 근육에서 포도당흡수를 증진시키거나 간세포에서 포도당합성을 억제하는 것은 당뇨병의 예방과 치료에 중요한 의미를 가진다. 본 연구에서는 진귤과피 발효추출물이 간세포에서 포도당합성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 실험방법

재료

제주지역에서 친환경재배법으로 재배된 진귤로부터 과피를 분리하여 상온 그늘에서 충분히 건조하였다. 건조된 과피를 분쇄하여 얻은 분말시료(100 g)를 80% 에탄올 1L로 실온에서 7일간 추

Correspondence to : Deok-Bae Park
Department of Histology, Jeju National University School of Medicine, 102 udaehakno, Jeju, 690-756, Korea
E-mail: parkdb@jeju.ac.kr

출한 후 Whatmann GF/C filter로 여과하여 상등액을 얻은 후 회전 농축기로 에탄올을 제거하고 남은 수층 시료를 진공 동결 건조하여 추출시료를 얻고 밀봉하여 냉동보관하였다. 발효과정은 진피추출시료와 동량(w/w)의 물과 5%(w/w) 설탕을 첨가하고 NaOH로 pH를 7.0으로 조절한 후 가압멸균(120°C, 25 min)하였다. 젖산균(*Lactobacillus plantarum*, ATCC8014)은 MRS 배지에서 38°C, 3일간 혐기, 정치배양하였고, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*, IFO 0203)는 YM 배지에서 25°C, 5일간 호기, 교반 배양하였다. 각 배양액을 혼합하여(젖산균 3×10^8 cells/mL; 효모 4×10^8 cells/mL) 전체 배지의 5%(w/v)로 접종하고 당밀을 3%(w/v) 첨가한 후 38°C에서 7일간 혐기배양하였다. 배양이 완료된 발효액은 급속냉동후 동결건조하고 진식분쇄기로 분말화하였다. Western blot 실험에서, PEPCCK, actin, G6pase- α 에 대한 1차 항체 및 2차 항체는 Santa cruz (Santa cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 포도당 측정시약은 아산제약(화성, 한국)으로부터 구입하였다. 그 외의 시약은 별도로 표시된 것 외에는 모두 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

본 연구에서는 흰쥐의 간암세포주인 H4IIE 세포를 세포주은행(서울)로부터 공여받아 사용하였다. 세포는 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 Dulbecco's Minimal Essential Medium (D-Mem) 배양액을 사용하였으며 5% CO₂ 및 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 T75 배양용기에서 배양된 후 우태아혈청이 제거된 serum-free 배양액에서 24 시간동안 전배양(serum-starvation)하고 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)로 2회 세척한 후 포도당이 없는 D-Mem으로 옮겨 실험에 사용하였다.

배양세포내 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 측정

ROS의 측정을 위해서 세포막 투과성 ROS 탐색자(probe)인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA)를 사용하여 세포질내 ROS의 생성과 축적을 측정하였다. 배양이 끝난 세포를 PBS로 세척한 후 10mmol/l의 H₂DCFDA를 함유한 PBS에서 37°C, 10분간 배양한 후 multiwell 형광측정기(Tecan, Austria)를 이용하여 485nm/535nm의 파장에서 형광의 강도를 측정하였다.

MTT assay

세포독성 또는 세포의 생존능의 지표인 mitochondria의 활성을 측정하기 위하여 MTT 측정법을 사용하였다. 시료의 처리가 끝난 뒤 세포배양액과 동량의 MTT reagent(1 mg/ml in D-PBS)를 섞어 37°C에서 30분 동안 더 배양한 후 상층액을 제거하고 200 μ l isopropanol을 넣어 발색반응을 유도하였으며 흡광도는 570-690nm에서 측정하였다.

전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 직접 5%의 2-mercaptoethanol을 포함한 cell lysis buffer[®]에 녹여 균질화시켰다. 70°C에서 10분간 가열하고 4-20%의 polyacrylamid gel에 전기영동하고 poly(vinylidene difluoride)(PVDF)에 흡착시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer(Tris-buffered saline-0.1%(w/v) Tween-20) (TBS-T)으로 상온에서 1시간동안 반응시키고 난 뒤 여러 가지 1차항체(1:1000-1:3000)가 들어있는 TBS-T에서 1시간(25°C) 또는 16시간(4°C)동안 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated 2차 항체와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence(ECL) 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

통계분석

대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성은 student's t-test를 사용하였고 p 수치가 0.05 이하일 경우 통계적 유의성을 부여하였다.

결과 및 고찰

체내 혈중 포도당 농도가 정상 수준 이하로 떨어지면 췌장에서부터 글루카곤 분비가 증가하며 간에서 포도당 합성을 증가시켜 혈중 포도당 농도를 정상 수준으로 회복시키며 반대로 혈중 포도당 농도가 상승하면 췌장에서 인슐린이 분비되어 근육에서의 포도당 흡수를 촉진하고 간에서의 포도당 합성을 억제한다⁸⁾. 배양세포 실험에서 간에서의 포도당합성을 측정하는 방법으로서, H4IIE 간세포를 포도당이 결핍되어 있는 배양액에서 배양하면서 세포배양액 내의 포도당 농도의 변화를 측정하였다. H4IIE 간세포를 24-well 배양접시에서, 포도당결핍배양액(glucose-free medium, GFM)에서 24 시간 배양한 후 배양액 내 증가된 포도당 농도를 측정하였다 (Fig. 1A, 1B). 먼저, H4IIE 간세포가 주어진 배양환경에서 인슐린의 처리에 의해 포도당 합성이 억제되는지를 측정하였다.

100 nM의 인슐린 처리는 아무 것도 처리하지 않은 대조군에 비해 배양액내 포도당 농도가 약 30% 수준으로 측정되어, 대조군 대비 70%의 포도당 합성 억제효과를 나타내었다. MTT 분석 결과 24시간 100 nM 인슐린의 처리는 세포에 아무런 독성을 일으키지 않았다. 진피추출물 (SE, 200 μ g/ml) 처리군의 경우 대조군 대비 약 40%의 억제효과가 보여졌으며 통계적으로 유의하였다. 다음으로는 간세포에서 포도당 합성에 중요한 역할을 하는 효소인 PEPCCK 단백질 수준이 인슐린이나 SE에 의해 변화하는지를 조사하였다. GFM에서 100nM의 인슐린이나 200 μ g/ml SE를 24시간 동안 처리하였을 경우 PEPCCK 단백질 수준이 현저하게 감소하였다 (Fig. 1C). 이러한 결과는 진귤과피 성분들이 간세포에서 포도당 합성을 억제하며 이는 포도당합성 조절효소 단백질 수준을 조절하는 경로를 포함하는 것임을 의미한다.

감귤류의 과피에는 naringin, hesperidin, rutin들과 같은 flavonoids, synephrine, tyramine, octapamine과 같은 alkaloids, nobiltin, tangeritin들과 같은 polymethoxyflavones들

이 다양하게 포함되어 있다⁹⁾.

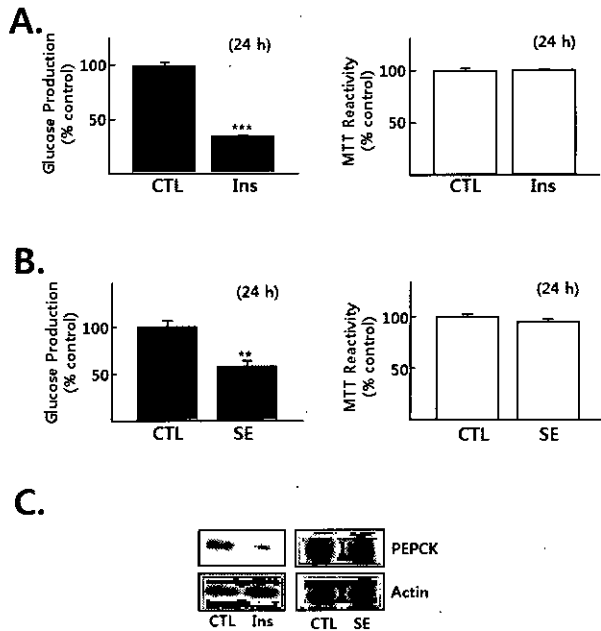


Figure 1. Effect of extract of *Citrus sunki* peel (SE) on glucose production in H4IIE cells. Confluent H4IIE cells were preincubated in serum-free medium (1g/L glucose) overnight and then further incubated in glucose-free medium with SE (200 μ g/ml). Glucose concentration in medium was measured after 24 h. Cell viability (MTT)(B) was measured after 24 h as described in 'materials and methods'. Western blot experiments for PEPCK and actin were performed after 24 h (C). Each bar is a mean \pm SE of 3 experiments. **p<0.01, ***p<0.001 vs. control. CTL, control; Ins, insulin (100 nM); SE, extract of *Citrus sunki* peel.

본 연구에서는 일차적으로 flavonoid 화합물인 hesperidin과 rutin이 H4IIE 세포에서 포도당합성에 영향을 미치는 지를 조사하였다. GFM에 배양중인 H4IIE 세포에 각각 50mM의 hesperidin과 rutin을 처리하고 24 시간 후에 배양액 내의 포도당 농도를 측정하였다 (Fig. 2A). 200 μ g/ml SE를 처리한 군에서는 대조군에 비해 포도당 농도가 유의하게 감소하였으나 hesperidin, rutin의 치료로는 포도당 농도에 변화가 없었다. PEPCK 단백질 수준 또한 hesperidin, rutin의 치료로 변화하지 않았다 (Fig. 2C).

Hesperidin, rutin의 포도당합성 억제효과와 함께, 산화스트레스에 의해 발생하는 세포생존의 감소에 미치는 영향을 조사하였다. GFM에 배양중인 H4IIE 세포에 각각 50 μ M의 hesperidin과 rutin을 30분간 전처리한 후 0.5mM의 과산화수소 (hydrogen peroxide)를 1시간 동안 처리한 후 H2DCFDA 형광표지자를 이용하여 세포내 활성산소종 수준을 측정하였다 (Fig. 3A). 0.5 mM의 과산화수소 1시간 처리후 활성산소종은 약 2.7배 증가하였으며 SE, hesperidin, rutin 처리는 이들 활성산소종의 증가를

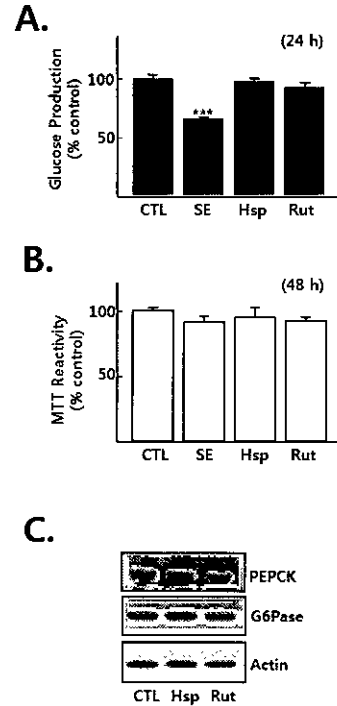


Figure 2. Effect of hesperidin and rutin on glucose production in H4IIE cells. Confluent H4IIE cells were preincubated in serum-free medium (1 g/L glucose) overnight and then further incubated in glucose-free medium with hesperidin or rutin (50 μ M, respectively). Glucose concentration in medium was measured after 24 h. Cell viability (MTT)(B) was measured after 24 h as described in 'materials and methods'. Western blot experiments for PEPCK, G6Pase and actin were performed after 24 h (C). Each bar is a mean \pm SE of 3 experiments. ***p<0.001 vs. control. CTL, control; SE, extract of *Citrus sunki* peel; Hsp, hesperidin; Rut, rutin.

억제하지 않았다. 그러나 0.5mM의 과산화수소를 48시간 동안 처리하면 유의하게 생존세포수준이 감소하였으며 SE, hesperidin, rutin 처리는 과산화수소 처리로 감소한 생존세포수준을 유의하게 회복시켰다. 이러한 결과는 SE, hesperidin, rutin이 적어도 1시간 이내의 산화스트레스를 효과적으로 억제하지는 못하지만 그 이후 지속적으로 산화스트레스를 억제하거나, 활성산소종을 직접 감소시키기보다는 산화스트레스로 유발되는 세포내 다른 세포상해 활성을 간접적으로 억제할 가능성을 시사한다.

간은 대사조절의 중추기관으로, 혈중 포도당 및 지질농도가 생리범위 이내에 적절하게 유지되도록 조절한다. 정상인 경우 장기간 영양공급이 결핍될 경우 간에서는 글리코젠을 분해하거나 새로 포도당합성을 증가시켜 에너지를 공급한다⁹⁾. 그러나 당뇨병 또는 인슐린저항성인 경우 혈중 포도당 농도가 높음에도 불구하고 간에서의 포도당합성이 억제되지 않고 지속된 결과 혈중 포도당 농도는 더욱 상승하게 된다¹⁰⁾. 이로부터, 간에서의 포도당 합성을 억제하는 물질을 발굴하기 위한 많은 연구들이 시도되어 왔

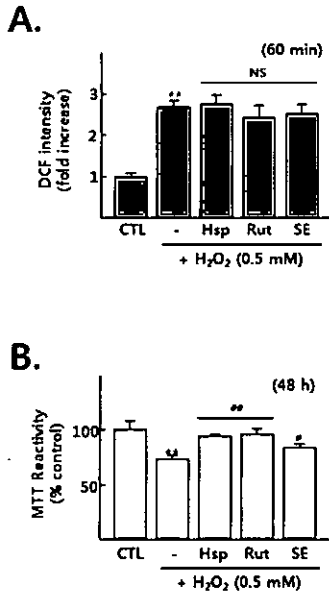


Figure 3. Effect of hesperidin and rutin on ROS in H4IIE cells. Confluent H4IIE cells were preincubated in serum-free medium (1 g/L glucose) overnight, pretreated with hesperidin or rutin in GFM (50 μM, respectively) for 30 min, and then treated with hydrogen peroxide. ROS content was measured after 1 h as described in 'materials and methods'. Cell viability (MTT) was measured after 48 h. *P<0.01 vs. control, *P<0.05, **P<0.01 vs. H₂O₂-alone. CTL, control; SE, extract of *Citrus sunki* peel; Hsp, hesperidin; Rut, rutin.

다. 녹차의 Epigallocatechin gallate¹³⁾, *Artemisia dracunculus* L의 폴리페놀 화합물¹⁴⁾, 감귤의 naringenin¹⁵⁾, 인삼의 Ginsenoside¹⁶⁾들과 같은 성분들이 배양 간세포 실험들에서 포도당 합성을 억제하는 것으로 보고된 바 있다.

본 연구에서 진귤과피 추출물이 H4IIE 세포에서 포도당 합성을 강력하게 억제하는 것으로 보여졌으나 적어도 플라보노이드인 hesperidin, rutin은 이 과정에 관여하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 alkaloids 또는 polymethoxyflavones 들과 같은 화합물이 포도당 합성 억제를 조절하는 활성이 있는 지는 계속 규명되어야 할 과제이다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음

참고 문헌

1) 김한용. 전남대학교 대학원 원예학과 농학박사 학위논문 (1988)

2) Francis AR, Shetty TK. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 1989;10:1953-1955.

3) Guengerich FP, Kim DM. *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* 1990;11:2275-2279.

4) Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju Food Ind. *Nutr* 2000;5(2):42-52.

5) 강신해, 이영재, 이창홍, 김세재, 이대호, 이영기, 박덕배. 제주자생 진귤과피의 생리활성. *한국식품과학회지* 2005;37(6): 983-988.

6) Cui ZG, Kim BY, Kang SH, Lee YJ, Lee DH, Lee YK, Park DB. Fermented peel of Citrus sunki Hort. ex Tanaka promotes ethanol metabolism and suppresses body fat accumulation. *Food Sci Biotechnol* 2007;16(2): 311-314.

7) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259):680-685.

8) Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol* 2007;45:51-62.

9) Rousff RL, Martin SF, Youtsey CO. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem* 1994;42:70-79.

10) Quinn PG, Yeagley D. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr. Drug Targets Immune. Endocr Metabol Disord* 2005;5:423-437.

11) Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall HK, Nawano M, Granner DK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 2002;277:34933-34940.

12) Govorko G, Logendra S, Wang Y, Esposito D, Komarnytsky S, Ribnicky D, Poulev A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I. Polyphenolic compounds from *Artemisia dracunculus* L. inhibit PEPCK gene expression and gluconeogenesis in an H4IIE hepatoma cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293: E1503-1510.

13) Purushotham A, Tian M, Belury MA. The citrus fruit flavonoid naringenin suppresses hepatic glucose production from Fao hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:300-307.

14) Kim SJ, Yuan HD, Chung SH. Ginsenoside Rg1 suppresses hepatic glucose production via AMP-activated protein kinase in HepG2 cells. *Biol Pharm Bull* 2010;33:325-328.