

# AMPK 활성화를 통한 목통의 항산화 효과

정은혜 · 김상찬 · 조일제\* · 김영우\*

대구한의대학교 한의과대학 Medical Research Center & 방제학교실

## Akebiae Caulis Inhibits Oxidative Stress through AMPK Activation

Eun Hye Jung, Sang Chan Kim, Il Je Cho\*, Young Woo Kim\*

Medical Research Center (MRC-GHF), College of Korean Medicine, Department of Herbal Formula, Daegu Haany University

*Akebiae Caulis* is a galenical originated from *Akebia quinata* Decaisne species. It is commonly used in the treatment of oposiuria, inflammation, nociceptive and fever. Here, we investigated the effect of *Akebiae Caulis* extract (ACE) to protect hepatocyte against the malfunction of mitochondria and apoptosis. Arachidonic acid (AA)+iron promoted excessive reactive oxygen species (ROS) production and exerted a deleterious effect on mitochondria. Treatment with ACE protected hepatocytes from AA+iron-induced cytotoxicity, as shown by alterations in the protein levels related with apoptosis such as poly(ADP-ribose) polymerase, pro-caspase 3, Bcl-XL and Bcl-2. Moreover, AA+iron-induced  $H_2O_2$  production, GSH depletion and mitochondrial dysfunction were alleviated by ACE pretreatment. As a potential molecular mechanism for the ACE-mediated cytoprotection, phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key regulator in determining cell survival or death, was increased by ACE. Moreover, ACE treatment enhanced inactive phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), downstream substrate kinase of AMPK. More importantly, ACE prevented a decrease in the GSK3 $\beta$  phosphorylation derived by AA+iron, which might contribute to mitochondrial protection and cell survival. To further identify essential compounds in *Akebiae Caulis* for the protection of AA+iron-mediated cytotoxicity, we found that betulin in combination with hederagenin protected from AA+iron-induced mitochondrial dysfunction. Betulin+hederagenin treatment also increased inactive phosphorylation of GSK3 $\beta$  in common with ACE. These results suggest that ACE protected hepatocytes against oxidative stress and mitochondrial dysfunction, which is mediated with inactive GSK3 $\beta$  phosphorylation downstream of AMPK.

keywords : *Akebiae caulis*, GSK3 $\beta$ , AMPK, arachidonic acid, iron

## 서 론

불안정하고 반응성이 강한 superoxide radical ( $\cdot O_2$ )과 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 등의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 세포의 지속적인 대사 과정에서 과도하게 생성되어 세포막의 지질을 산화시키고 단백질과 핵산 형태에 변화를 가져온다<sup>1,2)</sup>. 세포 내 과도한 활성산소종의 축적은 산화적 스트레스에 의한 세포자멸사 (apoptosis)를 유발하며<sup>3)</sup>, 산화적 스트레스는 노화, 동맥경화, 허혈성 심장질환, 암 등을 포함한 여러 질환의 발병기전으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 간세포를 포함한 인체 내 모든 세포들은 세포막과 세포 내 여러 부분에서 특이적으로 발생 가능한 활

성산소종의 부작용을 최소화하기 위해 catalase 및 glutathione peroxidase를 포함한 다양한 내제적 항산화 효소군의 발현을 증가시켜 세포 내 과도한 지질 과산화물의 축적을 억제하는 보호기전을 통하여 항상성을 유지한다<sup>2,4)</sup>. 따라서 만성 질환의 치료 및 예방 목적으로 세포 내 항산화능을 직·간접적으로 증가시킬 수 있는 다양한 항산화제에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며, 항산화 효능이 뛰어난 한약재의 탐색과 그 작용기전에 대한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다<sup>3,5,6)</sup>.

간 조직에 주로 저장되는 철의 과도한 축적은 간 실질세포 (hepatocytes)에서 산화적 스트레스와 대식세포 (macrophage)의 활성화를 통한 염증을 유발한다. 과도한 철의 축적은 세포 내 신호

\* Corresponding author

Young Woo Kim, Medical Research Center (MRC-GHF), College of Oriental Medicine, Department of Herbal Formula, Daegu Haany University, Kyungsan, Korea

·E-mail : ywkim@dhu.ac.kr ·Tel : +82-53-819-1861

Il Je Cho, Medical Research Center (MRC-GHF), College of Oriental Medicine, Department of Herbal Formula, Daegu Haany University, Kyungsan, Korea

·E-mail : skek023@dhu.ac.kr ·Tel : +82-53-819-1861

·Received : 2014/11/11 ·Revised : 2014/12/01 ·Accepted : 2014/12/12

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.02.29.1.18>

Available online at [http://society.kisti.re.kr/sv/SV\\_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13](http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13)

전달회로의 활성화를 통한 phospholipases의 활성을 증가시키고, 이를 통하여 아라키돈산 (arachidonic acid, AA)의 유리를 촉진한다<sup>7,8)</sup>. Prostaglandin의 전구체인 AA는 세포막의 구성 성분으로서 호르몬과 신경 전달 물질의 분비 등 다양한 생물학적 작용에 관여하며, 국소적 염증 조직 부위에서 그 농도가 증가하는 염증매개 물질로도 보고되고 있다<sup>9)</sup>. 지질 과산화를 통한 AA의 유리는 mitochondria 투과성 전이 통로 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP)를 개방하여 세포질로의 cytochrome c 유리를 증가시키고, 세포 내 ceramide의 농도를 높임으로써 세포자멸사 (apoptosis)를 유도한다<sup>10-12)</sup>. 따라서 지질 과산화를 통한 AA의 유리 및 철 축적을 통한 산화적 스트레스는 세포자멸사 신호회로의 활성화를 통한 실질세포의 사멸을 유도하며<sup>13,14)</sup>, 본 연구실에서는 선행연구를 통하여 AA 또는 철 단독 처치에 비해 AA와 철의 동시 처치 시 간 실질세포의 사멸이 촉진될 수 있음을 규명하였다. 그리고, 세포 사멸을 억제할 수 있는 다양한 약물들의 분자기전의 하나로서 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화를 제시하였는데, AMPK는 '에너지 센서'로 알려진 효소로서, 세포 내 에너지 대사의 조절을 통하여 세포 손상을 방어하는 분자로서 알려져 있다<sup>14,15)</sup>.

목통 (木通)은 우리나라 중부, 남부 지방 산야에서 자생하는 것으로<sup>4,16)</sup>, 목통의 항염증, 항산화 활성에 대한 연구<sup>17,18)</sup>가 보고되었으나, 항산화 작용에 관여하는 세포 내 분자기전에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 간 실질 세포주인 HepG2 cell에 AA와 철의 동시자극을 통한 세포자멸모델에서 목통 추출물 (*Akebiae caulis* extract, ACE)의 간 실질세포 보호 효능과 항산화 효능을 평가하고 이와 관련된 세포 내 분자 기전을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), anti-pro-caspase 3, anti-Bcl-XL, anti-Bcl-2, anti-phospho acetyl-CoA carboxylase (p-ACC), anti-phospho AMPK (p-AMPK), anti-phospho glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ) 그리고 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG는 Thermo (Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-AMPK 항체는 Santacruz Biotechnology Inc. (Santacruz, CA)에서 구입하였다. AA, rhodamine123 (Rh 123), SB216763은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA), ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA), anti- $\beta$ -actin 항체와 다른 시약들은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 추출물 제조

목통 (*Akebia quinata* (Thunb.) Decne.)은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여, 100 g을 물 1.2 L에 열수 추출하였

다. 300 mm filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과였고, 최종 수율은 9.96%이다.

### 3. 세포배양 및 처리

인체 유래 간 실질 세포주인 HepG2 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였다. 열처리한 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin를 혼합한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. Cell은 100 mm 배양접시에서 80% confluency에 도달하도록 배양하였고, 일주일에 2회, 1:4의 비율로 계대 배양하였다. 12시간 serum-starvation 후, *Akebiae caulis* extract (ACE)를 0.003-0.1 mg/ml의 농도로 1시간 전 처치 후, 10  $\mu$ M AA를 12시간 처치한 후 5  $\mu$ M iron을 첨가하여 1-3시간 추가 배양하였다.

### 4. MTT assay

세포 생존율을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. HepG2 cell을 24 well plate에 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well 농도로 0.5 mL/well 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였고, ACE를 최종농도 (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml)가 되도록 한 시간 전 처치, 10  $\mu$ M AA를 12시간 처치 후 5  $\mu$ M iron을 첨가하여 1시간 더 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (1 mg/ml)를 300  $\mu$ L씩 각 well에 처리하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 배지를 제거하고 MTT를 환원시켜 생성된 formazan 결정을 dimethylsulfoxide로 용해시킨 후, 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Immunoblot analysis

전세포 추출액 (whole cell lysates)은 배지를 제거한 HepG2 cell을 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 wash 후, radioimmunoprecipitation buffer 와 Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo, Rockford, IL, USA)을 혼합한 lysis buffer를 첨가하고, 4°C에서 10분간 반응한 후, 15,000  $\times$  g, 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하여 제조하였다. 샘플은 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후 enhanced chemiluminescent solution (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA), 또는 X-ray 필름에 감광하였고, 정량은 Image J를 이용하였다.

### 6. 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 측정

세포 내 활성산소를 측정하기 위하여 H2DCF-DA를 이용하였다. 처치된 세포에 10  $\mu$ M H2DCF-DA로 1시간 동안 37°C에서 반응하였고, Titertek Multiskan automatic microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 excitation 485 nm과 emission 535 nm 파장에서 형광강도를 측정하였다.

### 7. GSH analysis

환원된 GSH의 양을 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)로 측정하였다. 흡광도 405 nm에서 Titertek Multiskan automatic microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 8. Mitochondrial membrane potential (MMP) 측정

MMP의 변화는 막 삼투 양이온 형광 dye인 Rh 123으로 염색한 후, flow cytometry를 이용하여 분석하였다. HepG2 cell을 0.05 µg/ml Rh 123으로 30분간 염색한 후, trypsin을 처리하여 취하였고, 1% FBS를 첨가한 PBS에 재부유하여, Partec FACS flow cytometer (Goerlitz, DE)로 MMP를 확인하였다. 각 분석은, 한 샘플 당 20,000개 세포의 형광을 기록하였다.

#### 9. 통계처리

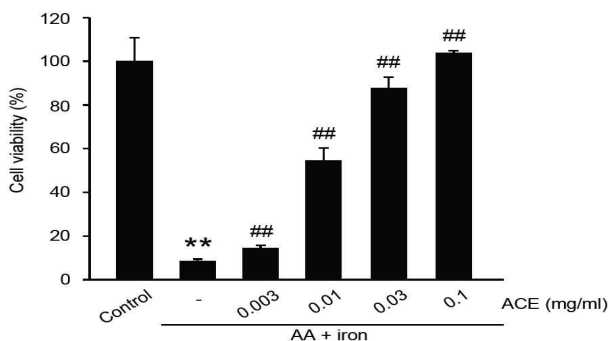
본 연구의 각 처리군은 student t-test를 사용하여 통계적으로 유의함을 나타내었다 ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). 모든 실험 결과는 mean  $\pm$  S.D. 으로 표시 하였다.

## 결 과

#### 1. Akebiae caulis extract의 농도별 처리가 HepG2 cell의 생존율과 apoptosis에 미치는 영향

목동 추출물 (*Akebiae caulis* extract, ACE) 자체의 세포독성을 확인하기 위해 간 실질 세포주인 HepG2 cell에 0.1 mg/ml 농도 이하의 ACE를 단독으로 24시간 처리한 결과 세포 독성을 나타내지 않았다 (data not shown). 다음으로 본 연구실의 확립된 방법<sup>14)</sup>에 따라 ACE의 간 실질 세포 보호 효능을 평가하기 위하여 HepG2 cell에 ACE (0.003-0.1 mg/ml)를 한 시간 전 처리 후, AA (10 µM, 12시간)와 iron (5 µM, 4시간)을 순차적으로 처리한 결과, ACE의 처리는 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였으며, 0.1 mg/ml의 농도에서 가장 효과적이었다(Fig. 1A). ACE의 AA+iron으로 유도된 세포자멸사 (apoptosis) 저해 효과를 연구하기 위하여 세포자멸사 관련 단백질의 발현을 immunoblot analysis로 확인하였다. HepG2 cell에 AA+iron 처리 시, apoptosis 과정에서 세포신호 전달에 주도적 역할을 하는 pro-caspase 3와 anti-apoptotic marker인 PARP, Bcl-XL, Bcl-2의 단백질 발현이 감소하였고, ACE는 이들 단백질의 감소를 현저히 억제하였다(Fig. 1B).

A)



B)

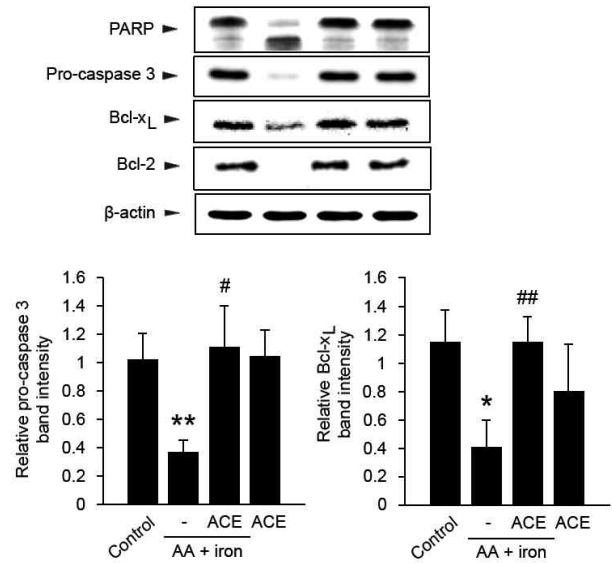
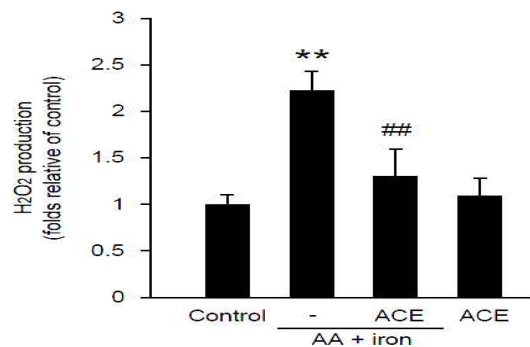


Fig. 1. Inhibition of AA+iron-induced cell death by *Akebiae caulis* extract (ACE). A) The effects of ACE on cell viability were assessed by MTT assays. HepG2 cells were treated with several concentrations of ACE for 1 h and 10 µM AA for 12 hrs, and then by exposure to 5 µM iron for 4 hrs. B) Immunoblotting for the proteins associated with apoptosis. Immunoblotting was assessed in the lysate of HepG2 cells incubated with 0.1 mg/ml ACE for 1 h, continuously 10 µM AA for 12 hrs plus 5 µM iron for 1 h. Equal protein loading was verified by  $\beta$ -actin immunoblotting. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. The statistical significance of differences between treatments and either the vehicle-treated control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) or cells treated with AA+iron (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ) was determined.

#### 2. AA+iron에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH 함량 변화

세포 내 활성산소의 증가는 대표적 내재 항산화물질인 GSH의 결핍을 통하여 세포사멸을 유도하며<sup>19,20)</sup>, 항산화 효능을 가지는 약물의 대부분은 세포 내 결핍된 GSH를 생성하기 위한 효소의 발현 및 활성 증가를 통하여 세포를 보호한다. AA+iron에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 GSH 함량 변화를 관찰한 결과, AA+iron의 처리는 HepG2 cell에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성을 증가시켰으며, ACE 전 처리는 AA+iron에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>생성을 통계적으로 유의한 수준으로 감소시켰다(Fig. 2A). 또한, AA+iron 처리에 의한 GSH의 감소가 0.1 mg/ml ACE 전 처리에 의해 통계적으로 유의하게 억제되었다(Fig. 2B). 이와 더불어 ACE 단독 처리 시에도 control군에 비하여 GSH가 증가하였다.

A)



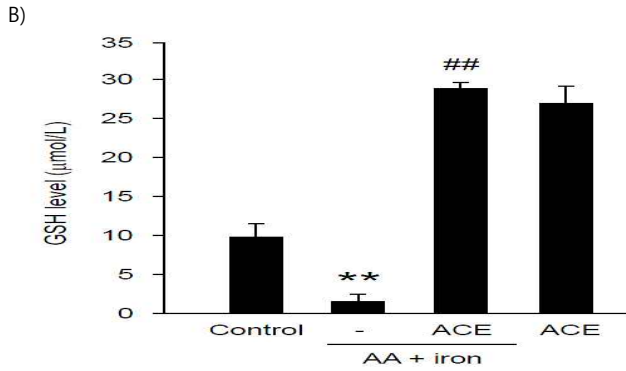


Fig. 2. Inhibition of hydrogen peroxide production by *Akebiae caulis* extract (ACE). A) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was determined in cells treated with 0.1 mg/ml ACE for 1 h and additionally with 10 μM AA for 12 hrs and 5 μM iron for 3 h. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured by using DCF fluorescence. B) Inhibition of decrease in GSH by ACE. GSH content in the cells treated described in the legend of Fig. 2A was assessed. Data represent the mean ± S.D. of repeated experiments. The statistical significance of differences between treatments and either the vehicle-treated control (\*\*p<0.01) or cells treated with AA+iron (##p<0.01) was determined.

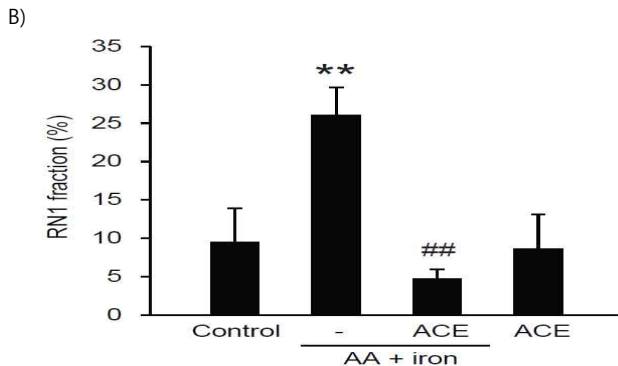
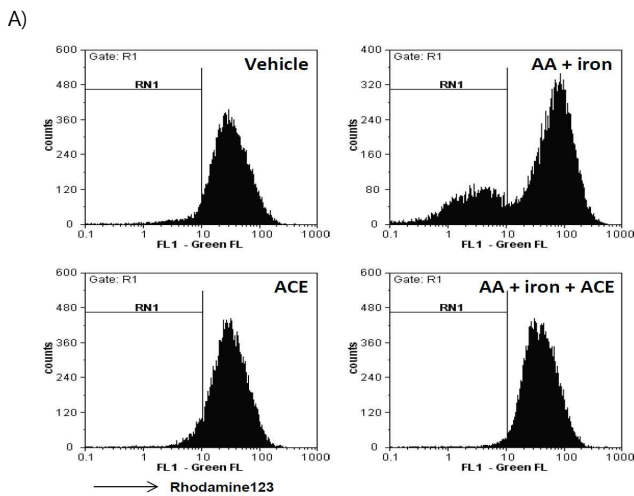


Fig. 3. Inhibition of AA+iron-induced mitochondrial dysfunction by *Akebiae caulis* extract (ACE). A) AA+iron induced changes on mitochondrial membrane permeability (MMP) in HepG2 cells. The cells were treated as described in the legend of Fig. 1B and stained with 0.05 ug/ml Rh 123. B) The relative RN1 fraction in the cells was quantified by flow cytometry analyses. Data represent the mean ± S.D. of three separate experiments. The statistical significance of differences between treatments and either the vehicle-treated control (\*\*p<0.01) or cells treated with AA+iron (##p<0.01) was determined.

3. *Akebiae caulis* extract의 mitochondrial dysfunction 저해 효과

ACE의 mitochondria 보호 효능을 확인하기 위하여 HepG2 cell을 Rh 123으로 염색한 후 flow cytometry로 분석하였다. 선행 연구결과에서와 같이 HepG2 cell에 AA+iron의 처치는 mitochondria 세포막의 기능저하를 유도하여 막 전위가 떨어지게 되어 Rh 123 형광의 감소를 야기한다<sup>14,15,21</sup>. 본 연구에서도 선행 연구결과와 마찬가지로 HepG2 cell에 AA+iron의 처치는 RN1 fraction을 증가시켰다(Fig. 3A-B). 0.1 mg/ml ACE의 전 처치는 AA+iron에 의해 증가되는 RN1 fraction을 통계적으로 유의한 수준으로 감소 시켰다(Fig. 3A-B). 이상의 결과는, ACE에 의한 세포 보호에 mitochondrial dysfunction의 역제가 매개됨을 나타낸다.

4. *Akebiae caulis* extract에 의한 AMPK 활성화

선행 연구결과에 따르면, AA+iron에 의해 유도된 세포사멸의 보호기전에 AMPK pathway와 활성화가 매개됨<sup>14</sup>이 보고되었다. 인산화를 통하여 활성화된 AMPK는 세포 내 다양한 효소의 활성을 인산화를 통하여 조절하며, 대표적인 기질에는 ACC가 있다<sup>22</sup>. 따라서 본 연구에서는 AA+iron에 의한 세포독성에 대한 ACE의 보호 효과의 분자기전으로서 AMPK pathway의 활성화가 매개되는지 여부를 규명하고자 하였다. HepG2 cell에 0.1 mg/ml ACE를 10분-6시간 처치한 결과, ACE는 AMPK의 인산화를 3-6시간에 가장 증가시켰으며(Fig. 4), 이와 더불어 AMPK의 하위 기질 단백질인 ACC의 인산화 정도는 6시간에 가장 높게 나타났다.

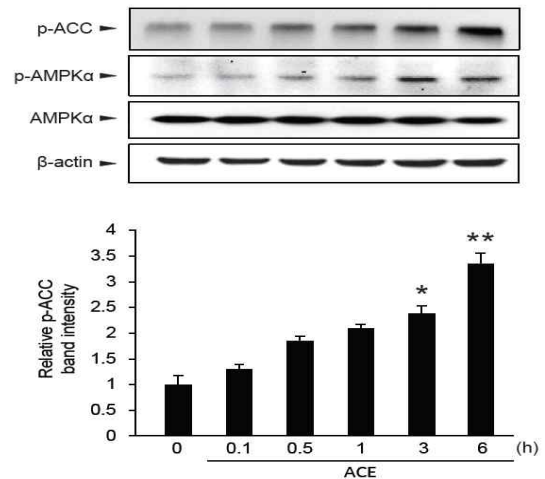


Fig. 4. Activation of AMPK by *Akebiae caulis* extract (ACE). Phosphorylations of ACC and AMPK (upper). 0.1 mg/ml of ACE was treated for the indicated time period. Equal protein loading was verified by AMPK and β-actin immunoblotting. Relative phosphorylated ACC were quantified (lower). The blots are representative results from repeated experiments. The statistical significance of differences between treatment group and the vehicle-treated control group was verified (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

5. *Akebiae caulis* extract에 의한 GSK3β 인산화

GSK3β는 serine/threonine kinase의 하나로서, glycogen 대사 이외에 apoptosis 및 세포의 다양한 기능을 조절하는 단백질로 알려져 있다<sup>23</sup>. 선행 보고에 의하면 AMPK의 활성화는 serine 9번 잔기의 인산화를 통하여 GSK3β의 활성을 억제하며, GSK3β의 불활

성화는 세포 보호 효능이 있는 것<sup>14,18)</sup>으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 ACE에 의한 AMPK 활성화가 하위 신호인 GSK3 $\beta$ 의 활성을 억제할 수 있는지 연구하였다. HepG2 cell에 ACE 0.1 mg/ml을 10분-6시간 처리하여 관찰한 결과, 시간 의존적으로 GSK3 $\beta$ 의 인산화를 더욱 증가시켰고, 6시간에서 가장 높은 인산화 증가를 나타내었다(Fig. 5A). 또한, AA+iron에 의해 감소된 GSK3 $\beta$ 의 인산화가 ACE 전 처치에 의해 억제되었다(Fig. 5B). 다음으로 ACE에 의한 GSK3 $\beta$  인산화의 세포 보호능을 확인하기 위하여 GSK3 $\beta$  inhibitor인 SB216763 (10  $\mu$ M)을 전 처치 한 후 AA+iron에 의한 세포독성에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, AA+iron으로 유도된 세포독성은 ACE와 마찬가지로 GSK3 $\beta$  inhibitor의 전 처치에 의해서도 감소하였다(Fig. 5C). 이상의 결과는, ACE가 AMPK의 활성화를 통하여 GSK3 $\beta$ 의 활성화를 억제하며, ACE에 의한 GSK3 $\beta$ 의 활성조절이 ACE의 세포 보호 효능에 관여함을 나타낸다.

6. Betulin과 hederagenin의 mitochondrial dysfunction 저해 효과  
 목통에는 akeboside 11종 및 betulin, myoinositol, stignasteral  $\beta$ -sitosterol, aristolochic acid, oleanolic acid, hederagenin, calcium, tannin 성분 등이 함유된 것으로 알려져 있으며 이 중 많은 연구가 이루어진 성분이 betulin과 hederagenin이다<sup>16,17,24)</sup>. 세포 보호 효능을 나타내는 목통 추출물 내 존재하는 유효성분을 규명하기 위하여 목통 유효성분 중 betulin과 hederagenin을 중심으로 연구하였다. 20  $\mu$ M betulin 및 200  $\mu$ M hederagenin을 각각 전 처치하여 MMP를 측정 한 결과, AA+iron로 유도된 MMP의 감소를 보호하지 못했다. 하지만 20  $\mu$ M betulin과 200  $\mu$ M hederagenin을 병용 처치하여 MMP를 측정 한 결과, AA+iron에 의해 증가되는 RN1 fraction을 감소시켰다(Fig. 6).

### 7. Betulin과 hederagenin에 의한 GSK3 $\beta$ 인산화

다음으로 ACE의 처치에 의해 관찰되었던 AMPK 활성화를 통한 GSK3 $\beta$ 의 억제가 betulin과 hederagenin의 병용 처치에 의해서도 나타나는지 확인하기 위하여 GSK3 $\beta$ 의 인산화를 관찰하였다. ACE와 마찬가지로 HepG2 cell에 20  $\mu$ M betulin과 200  $\mu$ M hederagenin의 병용 처치는 시간 의존적으로 GSK3 $\beta$ 의 억제적 인산화를 증가시켰다(Fig. 7).

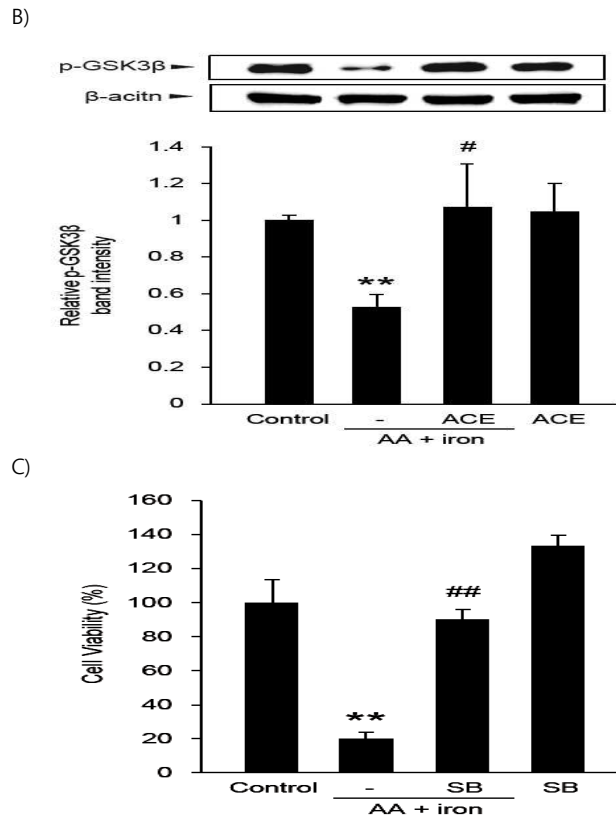
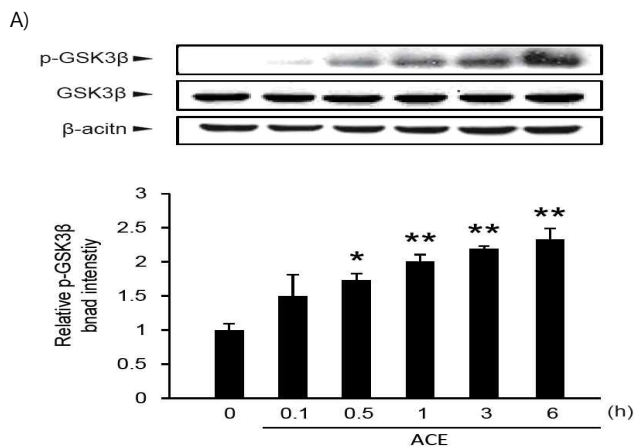


Fig. 5. GSK3 $\beta$  phosphorylation by *Akebiae caulis* extract (ACE). A) The time-course effect of ACE on GSK3 $\beta$  phosphorylation. Immunoblotting against phosphorylated GSK3 $\beta$  at serine-9 was assessed in the lysates of cells treated with ACE. Results were confirmed by three separate experiments. The statistical significance of differences between treatments and the vehicle-treated control was determined (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01). B) The effect of ACE on the decrease in GSK3 $\beta$  phosphorylation by AA+iron. HepG2 cells were incubated with ACE, as described in the legend of Fig. 1B. C) The effect of GSK3 $\beta$  inhibition on cell viability. HepG2 cells were incubated with 10  $\mu$ M SB216763 for 1 h and were continuously exposed to 10  $\mu$ M AA for 12 hrs and 5  $\mu$ M iron for 1 h. Cell viability was analyzed by MTT assay. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of four separate experiments. For B and C, the significance of differences between treatments and either the vehicle-treated (\*\* $p$ <0.01) or AA+iron-treated group (# $p$ <0.05, ## $p$ <0.01) was determined. SB, SB216763.

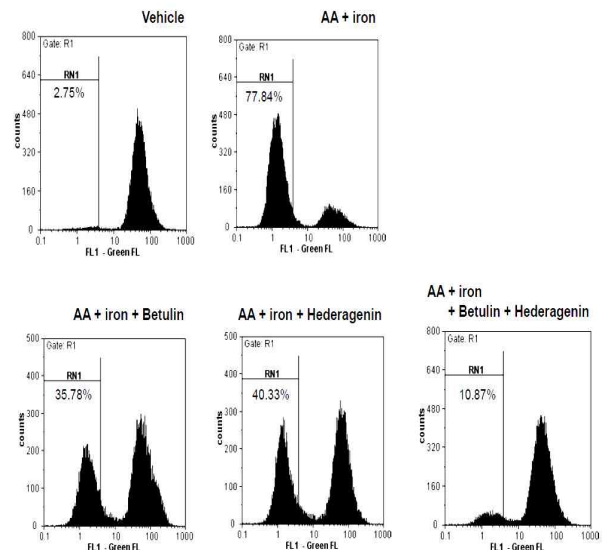




Fig. 6. Inhibition of AA+iron-induced mitochondrial dysfunction by betulin and hederagenin. The fluorescence of Rh 123 was measured in HepG2 cells treated with 20  $\mu$ M betulin and 200  $\mu$ M hederagenin, followed by exposure to 10  $\mu$ M AA and 5  $\mu$ M iron.

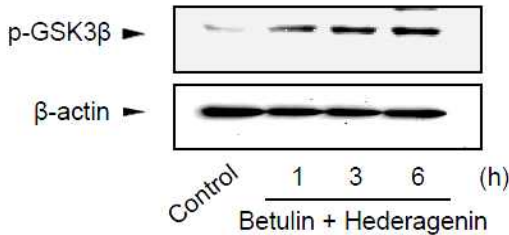


Fig. 7. Effect of betulin and hederagenin on GSK3 $\beta$  phosphorylation. Immunoblotting for phosphorylated GSK3 $\beta$  at serine-9 was conducted on lysates of cells that had been treated with 20  $\mu$ M betulin and 200  $\mu$ M hederagenin for the indicated time period (1-6 hrs).

## 고찰

목통 (木通)은 으름덩굴과 (Lardizablaceae)에 속한 낙엽 혹은 줄기나 뿌리를 건조한 것으로 덩굴줄기 구멍의 양 쪽 끝이 모두 통한다고 해서 목통이라 명명되었고, 성미는 차갑고 무독하며 맛은 쓰다<sup>16)</sup>. 유효 활성성분으로는 akeboside 및 betulin, oleanolic acid, hederagenin 등이 있으며, 이뇨효과, 위궤양 예방효과, 혈청 콜레스테롤과 triglyceride 상승억제작용, 항염증, 진통, 해열작용 등의 약리효과가 알려져 있다<sup>25,26)</sup>. 삼릉, 치자와 같은 다른 한약재에 비하여 목통의 항산화 활성이 더 높다는 연구<sup>27)</sup>가 보고되었으나, 그 기전에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다<sup>18)</sup>. 더구나, 이번 연구 결과는 기존의 항산화 효능을 보고한 논문이 현상적 측면에 치우친 데 반하여<sup>27)</sup>, 본 논문은 형광성 DCF를 이용한 ROS 측정과 GSH 함량 측정을 통해 보다 다각도로 효능을 확인한 점과 항산화 효능의 기전을 밝힌 점에서 최초의 연구결과라 할 수 있다.

산소는 인간의 생명을 유지하는 필수 요소이며, 격렬한 운동, 자가 산화, 물리적, 화학적, 환경적 자극에 의하여 활성산소를 생성한다<sup>28)</sup>. 적절한 양의 활성산소는 바이러스, 세균 등을 제거하지만, 과도하게 생성된 활성산소는 노화를 포함한 다양한 질환 발생의 주요 원인이 된다<sup>3)</sup>. 또한 체내 지질 과산화를 증가시켜 조직, 세포 손상을 일으키는 원인이 되기도 한다<sup>4)</sup>. 이러한 산화적 스트레스는 생체 내 활성산소의 증가와, 활성산소 소거제인 환원형 GSH의 감소를 가져온다. 비극성 분자인 H<sub>2</sub>DCF-DA는 세포 내로 용이하게 들어갈 수 있으며, esterase에 의해 비형광성 극성분자인 H<sub>2</sub>DCF로 분리된 후 세포 내 증가된 활성산소에 의해 산화되면서 형광성 DCF로 전환되어 녹색의 형광을 발한다<sup>14)</sup>. 환원형 GSH는 glutathione peroxidase에 의해 과산화수소를 제거하면서 산화형 GSH (GSSG)로 전환되고, GSSG는 glutathione reductase에 의하여 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되어 세포를 보호한다<sup>19)</sup>. AA와 iron의 병용 처치 시 이러한 활성산소의 생성을 통한 세포독성이 나타난다고 보고되었으며, 따라서 AA+iron 병용처치는 다양한 항산화 물질들의 세포 보호 효과를 평가하기 위한 세포모델로 활용되어 왔다<sup>14,15)</sup>. 그러므로 본 실험에서도 AA+iron을 사용하여 인체 유래 간세포

포주인 HepG2 cell에 산화적 스트레스를 유발하였고, 목통 추출물 (Akebiae Caulis extract, ACE)의 세포 보호 효과를 관찰하였다.

ACE의 세포 보호 효능은 MTT assay를 통하여 세포의 생존율을 측정하고, 세포자멸사와 관련된 PARP, pro-caspase 3, Bcl-XL, Bcl-2의 단백질들의 발현 변화를 immunoblot analysis로 확인하였다. 그 결과, ACE는 AA+iron으로 유도된 세포사멸을 농도 의존적으로 유의하게 억제하였고, 세포자멸사와 관련된 단백질들의 발현을 정상수준으로 회복함으로써 ACE의 세포 보호 효과를 확인하였다. 이와 더불어, ACE는 AA+iron에 의해 유도된 환원형 GSH의 감소 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 효과적으로 억제하였다. 이상의 결과는 ACE가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하고, ROS 생성을 저해하는 효과가 있는 신규 간세포 보호 물질이라는 것을 시사한다.

세포의 에너지 생성에 관여하는 mitochondria는 산소의 존재 하에서 산화-환원 반응을 통한 전자전달을 통하여 ATP를 생산하는 주요 세포 내 소기관이다<sup>29)</sup>. 산화적 스트레스는 mitochondria DNA의 돌연변이를 일으키거나 핵으로의 스트레스 신호 전달을 통하여 mitochondria 기능 장애를 유발한다<sup>30)</sup>. 손상된 mitochondria DNA는 전자의 흐름을 방해하고, mitochondrial permeability transition pore (mPTP)를 열어 불가역적인 세포자멸사를 유도한다<sup>31)</sup>. mPTP는 mitochondria 외막과 내막 사이의 정상적인 대사교환 단백질과 apoptosis 조절 단백질을 함께 함유한 다단백 복합체로<sup>30)</sup>, Ca<sup>2+</sup>과 산화스트레스가 증가된 상황에서 pore opening을 유도하여 mitochondrial pro-apoptotic 단백질인 cytochrome c의 비특이적인 유출을 야기하며 막 전위차 손실을 가져온다<sup>15,21,30)</sup>. 본 실험에서는 flow cytometry analysis를 통하여 mitochondrial membrane potential (MMP)를 측정하였고 AA+iron으로 유도된 mitochondrial dysfunction에 대한 ACE의 보호 효과를 확인하였다.

AMPK는 세포 내 스트레스 상황에서 지질과 포도당, 그리고 에너지 대사를 조절하는 serine/threonine 인산화 효소로서, 에너지 상태의 교란과 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 방어한다고 알려져 있다<sup>32)</sup>. AMPK는 격렬한 운동, 저산소증 및 허혈, 세포 내부의 스트레스 반응 등을 포함한 AMP 농도의 증가에 의해 활성화 되며, AMPK는 ATP가 소모되는 반응을 억제하고 이화작용을 유도하여 세포 에너지 준위를 보전하여 에너지 항상성을 유지한다<sup>32,33)</sup>. AMPK는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  3개의 소단위로 heterotrimeric complex를 이루고 있는데, 이 중  $\alpha$  소단위의 N-말단에 172번 threonine이 인산화 되는 것이 AMPK 활성화에 있어 중요한 역할을 담당한다<sup>22,34)</sup>. 본 연구에서 ACE가 AMPK를 활성화 되는 것을 AMPK의 인산화 증가를 통하여 확인하였다.

GSK3 $\beta$ 는 우리 몸 속 신호전달 체계 중에 세포질에 주로 존재하는 cytoplasmic serine/threonine 인산화 효소의 하나이다. GSK3 $\alpha$ 와 GSK3 $\beta$ , 2가지의 isoform이 있고, 중심부에 catalytic domain을 가진다<sup>35)</sup>. GSK3 $\beta$ 는 glycogen 대사를 조절하고, 상위기전의 신호를 받아 하위기전의 기질을 인산화 시켜 신호전달을 하며, 유전자발현, 세포주기, 사멸과 같은 다양한 세포 기능을 조절한다<sup>14)</sup>. GSK3 $\beta$ 는 정상상태에서 활성화 되고, serine-9 잔기의 인산화에 의해 불활성화 되며<sup>14)</sup>, GSK3 $\beta$ 의 억제성 인산화는 mPTP의 개방을 저

해한다. 산화적 스트레스는 GSK3 $\beta$ 를 더욱 활성화 시키고, mitochondria 내에서 활성화된 GSK3 $\beta$ 는 mPTP에 결합하여 mitochondria의 기능 장애를 야기한다<sup>23</sup>). 본 연구에서 ACE는 GSK3 $\beta$ 의 억제적 인산화를 증가시켰으며, AA+iron에 의해 증가된 GSK3 $\beta$ 의 활성을 억제하였다. AA+iron에 의한 세포독성에 GSK3 $\beta$ 의 활성화가 매개됨을 GSK3 $\beta$  inhibitor인 SB216763 처치에 의해 서로 확인할 수 있었다. 따라서 목통은 AMPK pathway 활성화에 의한 GSK3 $\beta$ 의 억제를 통하여 세포 보호 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

목통을 구성하는 여러 가지 성분 중에 betulin과 hederagenin은 신경종양, 피부암 등과 같은 질병에 항암 효과와, 항염증 효과가 있다고 보고되었다<sup>17,24,36</sup>). 특히 betulin은 급성 간염에서 항산화 효과를 나타내었다<sup>37</sup>). 기존 세포주를 활용한 문헌보고에 의하면 betulin (10  $\mu$ M) 및 hederagenin (120  $\mu$ M)은 세포 보호 효능 및 항산화 효능을 가지는 것으로 보고하였다<sup>38,39</sup>). 본 연구에서는 목통 추출물의 세포 보호 효능을 나타내는 후보 유효성분에 대한 연구로서 betulin 및 hederagenin의 효능을 평가하였다. 예비 선행연구를 통하여 betulin (0.5–20  $\mu$ M)과 hederagenin (5–200  $\mu$ M)을 단독으로 HepG2 세포에 처치하였을 때 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 따라서, 20  $\mu$ M betulin과 200  $\mu$ M hederagenin을 사용하여 실험을 진행하였다. 20  $\mu$ M betulin 및 200  $\mu$ M hederagenin을 각각 전 처치하였을 때 보다, 병용 처치 한 후 MMP를 측정하였을 때, AA+iron로 유도된 MMP의 감소를 유의하게 방어함으로써 ACE와 유사하게 AA+iron에 의한 mitochondria의 손상을 보호하였다. 또한, 20  $\mu$ M betulin과 200  $\mu$ M hederagenin의 병용 처치는 시간 의존적으로 GSK3 $\beta$ 의 인산화도 증가시켰다. 따라서 본 실험을 통하여 확인된 betulin과 hederagenin이 단독으로 처치할 때보다 두 가지 약물을 병용 처치하였을 때 효능이 증가됨을 확인한 연구결과는 개개의 구성 약물보다 배합된 약물의 처치가 더욱 효과적이라는 결과를 시사한다.

## 결 론

본 연구에서는 AA+iron에 의해 HepG2 cell의 세포 독성을 유발하고 목통 추출물 (*Akebiae Caulis* extract, ACE)의 간세포 보호 효능 및 이와 관련된 신호분자 기전을 규명하였다.

ACE는 AA+iron에 의해 유도된 ROS 증가와 GSH 감소에 기인한 세포독성으로부터 세포를 보호한다.

ACE는 AA+iron으로 유도된 mitochondrial dysfunction을 억제하여 mitochondria 보호 효과를 가진다.

ACE는 AMPK 활성화와 GSK3 $\beta$ 의 인산화를 조절하며, 이를 통하여 세포를 보호한다.

목통의 유효성분에 대한 연구로서 betulin과 hederagenin의 병용 처치 시, ACE와 마찬가지로 mitochondria 보호 효과 및 GSK3 $\beta$  활성억제를 나타내었다.

이상의 결과를 통하여, ACE는 산화적 스트레스의 억제와 미토콘드리아의 보호를 통하여 AA+iron에 의해 유도된 간 실질 세포의 사멸에 대한 보호 효과를 나타내었으며, ACE의 분자기전으로서

AMPK-GSK3 $\beta$  신호조절을 제시하였다. 추후 in vivo 실험에서 ACE의 간보호 효능 확인과 더불어 betulin과 hederagenin을 중심으로 한 성분연구와 기전연구가 지속된다면 목통을 간보호 효능을 가지는 신규 약물로서 개발할 수 있을 것이라 사료된다.

## 감사의 글

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No.2014R1A2A2A01007375) and partly by the Korea government (MSIP)(No.2012R1A5A2A42671316). Eun Hye Jung would like to thank the M.S. program at Daegu Haany University for completing the Master's thesis through this work.

## References

- Kim, Y.S., Lee, S.J., Hwang, J.W., Kim, E.H., Park, P.J., Jeon, B.T. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on t-BHP induced oxidative stress in Chang cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(11):1525–1531, 2011.
- Oh, J.M., Lee, J.Y., Lee, G.H., Kim, B.H., Kim, S.K. Evaluation oxidative stress and antioxidant enzyme expression in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells treated with stearic acid. *Yakhak Hoeji* 56(1):14–19, 2012.
- Yang, J.M., Jun, Y.J., Nam, J.Y., Son, M.Y., Sung, J.S., Kim, D.I. The cell protective effects of *Dioscoreae Rhizoma* by antioxidant activities on HeLa cells. *J Orient Obstet Gynecol* 21(2):97–107, 2008.
- Lee, S.Y., Wi, H.R., Lee, M.S. Comparison of the antioxidant effects of diallyl sulfide, capsaicin, gingerol and sulforaphane in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed HepG2 cells. *Korean J Nutr* 44(6):488–497, 2011.
- Jang, J.R., Hwang, S.Y., Lim, S.Y. Inhibitory effect of extracts of *Platycodon grandiflorum* (the Ballon Flower) on oxidation and nitric oxide production. *Korean J Food Preserv* 18(1):65–71, 2011.
- Kim, I.H., Cho, K.J., Ko, J.S., Kim, J.H., Om, A.S. The protective effects of *chrysanthemum cornarium* L. var. *spatiosum* extract on HIT-T15 pancreatic  $\beta$ -cells against alloxan-induced oxidative stress. *Korean J Food & Nutr* 25(1):123–131, 2012.
- Galaris, D., Pantopoulous, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crti Rev Clin Lab Sci* 45(1):1–23, 2008.
- Neufeld, E.J. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major:

- new data, new questions. *Blood* 107(9):3436-3441, 2006.
9. Choi, C.S., Kim, Y.W., Lee, H.S., Yoon, T.H., Cho, B.M., Lee, S.I., Kim, S.S., Hwang, I.K. Effects of zinc plus arachidonic acid on insulin resistance in high fructose-fed rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(4):415-422, 2009.
  10. Claria, J. Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1(3):369-382, 2006.
  11. Monjazeb, A.M., High, K.P., Koumenis, C., Chilton, F.H. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(6):464-474, 2005.
  12. Nakanishi, M., Rosenberg, D.W. Roles of cPLA2a and arachidonic acid in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1761(11):1335-1343, 2006.
  13. Balboa, M.A., Balsinde, J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta* 1761(4):385-391, 2006.
  14. Choi, S.H., Kim, Y.W., Kim, S.G. AMPK-mediated GSK3 $\beta$  inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochemical Pharmacol* 79(9):1352-1362, 2010.
  15. Shin, S.M., Kim, S.G. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1,2-dithiole-3thione congeners. *Mol Pharmacol* 75(1):242-253, 2009.
  16. Lee, S.M., Kwon, T.H., Ok, I.S., Yun, Y.G. Study on application of *Lignum akebiae* main blended prescription from *Dongeu-ybogam*. *Korean J Orient Med Prescr* 13(1):195-213, 2005.
  17. Oh, S.H., Choi, J.E., Lim, S.C. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology* 220(1):1-12, 2006.
  18. Park, C.S. Antioxidative and nitrite scavenging abilities of medicinal plant extracts. *Korean J Food Preserv* 12(5):631-636, 2005.
  19. Ko, I.H., Yeo, J.D. The Effect of glutathione contents of white Ginseng (WG) extracts and entomopathogenic fungi extracts on the liver in mice that was irradiated by radiation. *J Korean Soc Radiol* 6(2):99-106, 2012.
  20. Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Yang, S.R., Megson, I.L., Rahman, I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(3):L478-488, 2008.
  21. Zamzami, N., Maise, C., M etivier, D., Kroemer, G. Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol* 80: 327-340, 2007.
  22. Ha, J.H., Lee, S.H. Role of AMPK in the regulation of cellular energy metabolism. *J Korean Soc Endocrinol* 25(1):9-17, 2010.
  23. Koh, S.H., Kwon, H.S., Oh, H.S., Oh, J.H., Park, Y.J., Kim, J.G., Kim, K.S., Kim, Y.S., Yang, K.H., Kim, S.U., Kim, S.H., Jung, H.K. Effect of epigallocatechin gallate on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3 pathway in oxidative-stressed N18D3 cells following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. *Kor J Clin Pharm* 13(1):29-39, 2003.
  24. Wang, J., Zhao, X.Z., Qi, Q., Tao, L., Zhao, Q., Mu, R., Gu, H.Y., Wang, M., Feng, X., Guo, Q.L. Macranthoside B, a hederagenin saponin extracted from *Lonicera macranthoides* and its anti-tumor activities in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 47(7):1716-1721, 2009.
  25. Han, B.J., Woo, S.K., Shin, H.K. Effects of the water extract of *Akebia* (*Akebia quinata* Decaisne) on the growth of *Clostridium perfringens* and intestinal microorganisms. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23(6):633-640, 1995.
  26. Jang, G.Y., Kim, H.Y., Lee, S.H., Kang, Y.R., Hwang, I.G., Woo, K.S., Kang, T.S., Lee, J.S., Jeong, H.S. Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant activity of several medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41(7):914-920, 2012.
  27. Kim, J.G., Kang, Y.M., Eom, G.S., Go, Y.M., Kim, T.Y. Antioxidative activity and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants (*Akebia quinata* Decaisn, *Sciruf luviatilis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* Makino). *J Agric Life Sci* 37(4):69-75, 2003.
  28. Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Bolor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52:794-804, 2004.
  29. Yoon, J.H., Ryu, B.H., Kim, J.S., Yoon, S.H. Effects of *Curcuma longa* L. on some kinds of cancer cells. *Korean J Orient Int Med* 27(2):429-443, 2006.
  30. Cho, I.Y., Sheen, Y.Y. Effect of dioxin on the change of mitochondrial inner membrane potential and the induction of ROS. *J ENVIRON TOXICOL* 24(1):33-41, 2009.
  31. Nam, J.W., Lee, Y.S. Role of NADPH oxidase in the mechanism of arachidonic acid-induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Yakhak Hoeji* 56(2):80-85, 2012.



32. Wu, S.B., Wu, Y.T., Wu, T.P., Wei, Y.H. Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochem Biophys Acta* 1840(4):1331-1344, 2014.
33. Park, C.S., Kim, J.H., Oh, Y.K., Kim, K.H., Choi, C.W., Cho, E.S., Jeong, Y.D., Park, S.K. AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribose) decreases protein synthesis in C2C12 myotubes cultured in high glucose media. *J Anim Sci Technol* 54(5):369-373, 2012.
34. Choi, H.C. AMP-activated protein kinase activating agent and its implication. *Endocrinol Metab* 27(2):109-115, 2012.
35. Nam, J.Y., Roh, J.J., Seung, J.H., Son, M.Y., Khil, M.J., Sung, J.S., Kim, D.I. Non-toxic and Anti-oxidative effect of *Dioscorea* rhizoma on PC12 cell. *J Orient Obstet Gynecol* 19(4):61-76, 2006.
36. Jang, H.J., Lee, C.O., Lee, K.T., Park, H.J. Structure activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biol Pharm Bull* 27(5):744-747, 2004.
37. Miura, N., Matsumoto, Y., Miyairi, S., Nishiyama, S., Naganuma, A. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. *Mol Pharmacol* 56(6):1324-1328, 1999.
38. Ahn, S.J., Kim, J.W., Chun, Y.H., Hong, J.P. The antibacterial effect of hederagenin monodesmosides on anaerobes in the saliva. *Korean J Oral Med* 27(3):321-331, 2002.
39. Szuster-Ciesielska, A., Plewka, K., Daniluk, J., Kandefer-Szerszeń, M. Betulin and betulinic acid attenuate ethanol-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS), cytokine (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) production and by influencing intracellular signaling. *Toxicology* 280(3):152-163, 2011.