



Original Article / 원저

## AMPK 활성화를 통한 素馨花 (*Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*) 열수 추출물의 HepG2 간세포 보호 활성

박상미<sup>1</sup>, 정대화<sup>2</sup>, 민병구<sup>3</sup>, 제갈경환<sup>1</sup>, 변성희<sup>1</sup>, 김재광<sup>1\*</sup>, 김상찬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 한의과대학, <sup>2</sup>대구한의대학교 제약공학과,  
<sup>3</sup>한국유나이티드제약(주)

## Hepato-Protective Activities of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* Aqueous Extract via Activation of AMPK in HepG2 Cells

Sang Mi Park<sup>1</sup>, Dae Hwa Jung<sup>2</sup>, Byung Gu Min<sup>3</sup>, Kyung Hwan Jegal<sup>1</sup>,  
Sung Hui Byun<sup>1</sup>, Jae Kwang Kim<sup>1\*</sup>, Sang Chan Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Korean Medicine, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering,  
Daegu Haany University, <sup>3</sup>KOREA UNITED PHARM. INC.

### ABSTRACT

**Objectives** : *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* is used as a traditional or folk remedy in China to treat arthritis, hepatitis, duodenitis, conjunctivitis, gastritis, and diarrhea. In this study, we aimed to study the hepatocyte protective activity and molecular mechanism of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* aqueous extract (JGW) using HepG2 hepatocyte cell lines.

**Methods** : HepG2 cells were pretreated with diverse concentrations of JGW, and then the cells were exposed to tert-butyl hydroperoxide (tBHP) for inducing oxidative stress. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production, glutathione (GSH) concentration, mitochondrial membrane potential (MMP) and cell viability were measured to investigate hepato-protective effects of JGW. Phosphorylation of AMP-activated protein kinases (AMPK), acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) and effects of compound C on cell viability were examined to observe the role of AMPK on JGW-mediated cytoprotection.

**Results** : Pretreatment with JGW (10-300 µg/mL) significantly suppressed cytotoxicity induced by tBHP in a concentration dependent manner and reduced the expression of cleaved PARP and cleaved caspase-3 proteins related to apoptosis in HepG2 cells. In addition, pretreatment with JGW significantly prevented the increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

© 2023 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

production, GSH depletion, and lower MMP induced by tBHP. Treatment with JGW (30 minutes of incubation and concentrations of 100 and 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) increased the phosphorylation of AMPK and ACC and treatment with compound C, a chemical inhibitor of AMPK, inhibited the cytoprotective effect of JGW.

**Conclusions** : Our results demonstrated that JGW may protect hepatocytes from oxidative stress via activation of AMPK.

**Key-words** : *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* aqueous extract (JGW), AMP-activated protein kinase (AMPK), Oxidative stress, tert-butyl hydroperoxide (tBHP), HepG2 cells

## I. 서론

산화적 스트레스는 조직과 세포의 손상을 유도하며, 다양한 인간 질병을 야기하는 주요 원인이다<sup>1,2</sup>. 많은 양의 reactive oxygen species(ROS)은 막 인지질을 변형시킬 수 있으며, 지방산 산화는 세포 신호 전달을 손상시킬 수 있다. 특히, 오메가-6 지방산인 arachidonic acid(AA)는 염증에 관여하며 necrosis 및 apoptosis 유도에 기여한다<sup>2-4</sup>. 더욱이, AA와 철은 상승적으로 더 많은 ROS를 생성하고 미토콘드리아 기능 장애 및 apoptosis를 유발한다<sup>5,6</sup>. 또한, tert-Butyl hydroperoxide (tBHP)는 산화적 스트레스를 유도하여 apoptosis를 일으키는 주요 지질 과산화물 유도체 중 하나이며, 이 화합물이 HepG2 세포에서 활성산소종의 증가, 미토콘드리아 막전위 저하, 환원형 glutathione (GSH)의 고갈을 통하여 apoptosis를 유도할 수 있음을 보고하였다<sup>7-10</sup>.

에너지 상태의 세포 센서인 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 대사질환 치료를 위한 중요한 표적이며<sup>11</sup>, 산화적 스트레스에 반응하여 에너지 항상성, 세포사멸 및 세포 생존에 중요한 역할을 한다<sup>5,11</sup>. 또한 AMPK는 catalytic  $\alpha$ -subunit과 regulatory subunit인  $\beta$ - 및  $\gamma$ -subunit로 이루어진 이종 삼량 complex로 있는 serine/threonine 인산화 효소 중, 하나로 carbohydrate, protein, fat의 이화작용을 통한 ATP 생성을 촉진하고, fatty acid 생합성과 gluconeogenesis를 포함한 ATP 소비 pathway 억제하여 세포 내 energy homeostasis 유지에 관여하는 효소이다<sup>12,13</sup>. 또한 AMPK의 활성화는 산화적 스트레스에 의하여 손상된 미토콘드리아의 재생과 신생에 관여하는 유전자들의

발현을 증가시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다<sup>12-14</sup>. 특히, 간은 동물의 주요 생체 기관 중 하나로, 대표적으로 해독 작용을 하며, 단백질을 합성하고, 양분을 저장하며, 쓸개즙, 요소 등을 생성한다. 여러 가지 원인에 의하여 발생하는 산화적 스트레스는 간 실질세포의 사멸과 이를 통한 염증세포 및 정상세포의 활성화를 통하여 지방간, 간염, 간섬유화, 간경화와 간암 등 여러 가지 간질환을 일으키는 주요 원인이다<sup>15,16</sup>.

素馨花(*Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*)는 *Jasminum* thunb. 속(Oleaceae)의 식물로 아시아와 아프리카의 온대 및 아열대 지역에 널리 분포되어 있다. *Jasminum sambac*, *Jasminum polyanthum*, *Jasminum nudiflorum* 및 *Jasminum lang*과 같은 많은 *Jasminum* 식물의 꽃은 중국에서 관절염, 간염, 결막염, 위염 및 설사 치료를 위한 전통 또는 민간 요법으로 사용되었다. 또한, *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*은 중국 남부에서 간염 및 십이지장염 치료를 위한 민간 요법으로 사용되는 *Jasminum* 식물 중 하나이다<sup>17</sup>. 더욱이 素馨花의 性은 平하고 無毒하며, 간염을 치료하고, 또한 간경화의 간부위 통증을 치료하며, 흉협부위의 부적감, 심위의 기통, 하리복통을 치료한다. 그 복용량은 2-3錢을 煎服한다<sup>18</sup>. 현재까지 素馨花에 대한 연구로는 성분 분석연구<sup>19-22</sup>, 항바이러스 (HBV)효능에 대한 연구<sup>17</sup>, 세포유전학적 활성에 대한 연구<sup>23</sup>만이 보고되어 있으며, 소형화에 대한 항산화 효능에 관한 분자적 기전에 대한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 HepG2 간세포에 지질 과산화물 유도체 중 하나인 tBHP를 처리하여 산화적 스트레스를 통한 세포 독성을

\*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.

\*Corresponding author: Jae Kwang Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.  
Tel : +82-53-819-1263, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : October 26, 2023 / Revised : November 8, 2023 / Accepted : November 9, 2023

유도하여, 素馨花 열수 추출물(JGW)의 간세포 보호 활성 및 그 분자기전을 연구하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), anti-caspase 3, anti-phospho-acetyl coenzyme A carboxylase (ACC), anti-phospho-AMPK 그리고 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. anti-ACC와 anti-AMPK 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. tBHP 및 rhodamine123는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (HDCF-DA), anti- $\beta$ -actin 항체와 다른 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 추출물 제조

素馨花는 한국유나이티드제약 연구소 (Seoul, Korea)로부터 제공받았으며, 200 g을 물 2.4 L에 넣어 열수 추출하였다. 素馨花 열수 추출물 (*Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* aqueous extract; JGW)을 300 mm filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하고, 여과액을 회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 그 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 동결한 후, 동결건조기 (LABCONCO, USA)로 동결건조물을 수득하였다 (수율 11.55%). 素馨花 추출물은 사용 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 실험 직전 素馨花 추출물을 물에 녹인 다음 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Millipore, USA)로 여과 후 사용하였다.

### 3. 세포배양

인체 유래 간 실질 세포주인 HepG2 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 열처리된 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL, Eggenstein, Germany)과 100 units/mL penicillin 및 100  $\mu\text{g/mL}$

streptomycin (Gibco/BRL)을 혼합한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco/BRL) 배지를 사용하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건이 유지되는 배양기에서 HepG2 cell을 배양하였다. Cell은 100 mm dish에서 confluence가 80% 이상이 되도록 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

### 4. 세포생존율 측정

MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. HepG2 cell을 24 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 0.5 mL/well을 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였고, 이후 12시간 serum을 고갈시킨 후, JGW를 10-300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고, 1시간 뒤에 150  $\mu\text{M}$  tBHP를 처리하여 12시간 배양하였다. 여기에 MTT 0.5 mg/mL를 각 well당 300  $\mu\text{L}$ 씩 처리하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 반응시켰다. 배지를 조심스럽게 제거하고 MTT를 환원시켜 생성된 formazan 결정을 dimethylsulfoxide (DMSO)로 용해시킨 후, 570 nm에서 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 5. Immunoblot analysis

배양 및 약물 처리한 HepG2 cell은 수거하여 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고, radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)와 Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 혼합한 lysis buffer를 첨가하여,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후,  $15,000 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 전세포 추출액 (whole cell lysates)을 제조하였다. 전세포 추출액은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)를 이용하여 단백질의 함량을 정량하였다. 추출한 단백질을 Laemli's sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 섞어 5분간 끓인 후, 8-12%의 polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하고, 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 5% skim milk로 1시간 이상 blocking하였다. 각각의 일차항체 (anti-PARP, anti-

caspase 3, anti-p-AMPK, anti-AMPK, anti-p-ACC, anti-ACC, anti- $\beta$ -actin)는 1:1000의 비율로 반응시키고 이차항체는 1:5000의 비율로 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 관심 단백질의 발현 정도를 Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)에서 관찰하였다. 발색 후 각 단백질의 발현을 정량하기 위하여 ImageJ 프로그램 (<http://imagej.nih.gov/ij>)을 이용하여 densitometric analysis를 실시하였다.

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

MMP의 변화는 막 삼투 양이온 형광 dye인 rhodamine123로 염색 한 후, 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 약물을 처리한 HepG2 cell을 0.05  $\mu$ g/mL rhodamine123으로 30분 동안 염색한 후, trypsin을 처리하여 세포를 취하였고, 1% FBS를 첨가한 PBS에 재부유하여, flow cytometer (Accuri™ C6 Plus, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 MMP를 측정하였다. 각 분석은 한 샘플 당 10,000개 세포의 형광을 기록하였다.

#### 7. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production 생성량 측정

DCFH-DA는 cell-permeable non-fluorescent probe로서 세포 내에서 intracellular esterases 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCF-H)로 전환되고, ROS가 발생하는 곳에서 형광을 발하는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산화반응이 일어난다. 약물 처리한 HepG2 cell을 10  $\mu$ M DCFH-DA로 37°C에서 30분 동안 염색한 후, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 DCF의 형광강도를 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 상대적으로 평가하였다. DCF의 형광강도는 excitation (485 nm)와 emission (530 nm)로 microplate reader (Infinite M200 pro)을 사용하여 측정하였다.

#### 8. GSH 함량 분석

약물 처리한 HepG2 cell에 metaphosphoric acid를 첨가하여 용해한 후 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)로 환원된 GSH 함량을 흡광도 405 nm에서 microplate reader (Infinite M200 pro)를 이용하여 분석하였다. 측정된 흡광도는

BCA protein assay를 통한 단백질의 농도로 보정하였다.

#### 9. 통계 분석

평가의 분석 값들은 mean  $\pm$  S.D.로 나타내었다. 각 처리군은 one way analysis of variance를 사용하였으며, 사후검정은 등분산가정이 성립하였을 때에는 Tukey HSD test를 사용하였고, 등분산 가정이 성립하지 않았을 경우에는 Dunnett test를 사용하였다. 통계적 유의성 검정은  $P < 0.05$  또는  $P < 0.01$ 로 하였다.

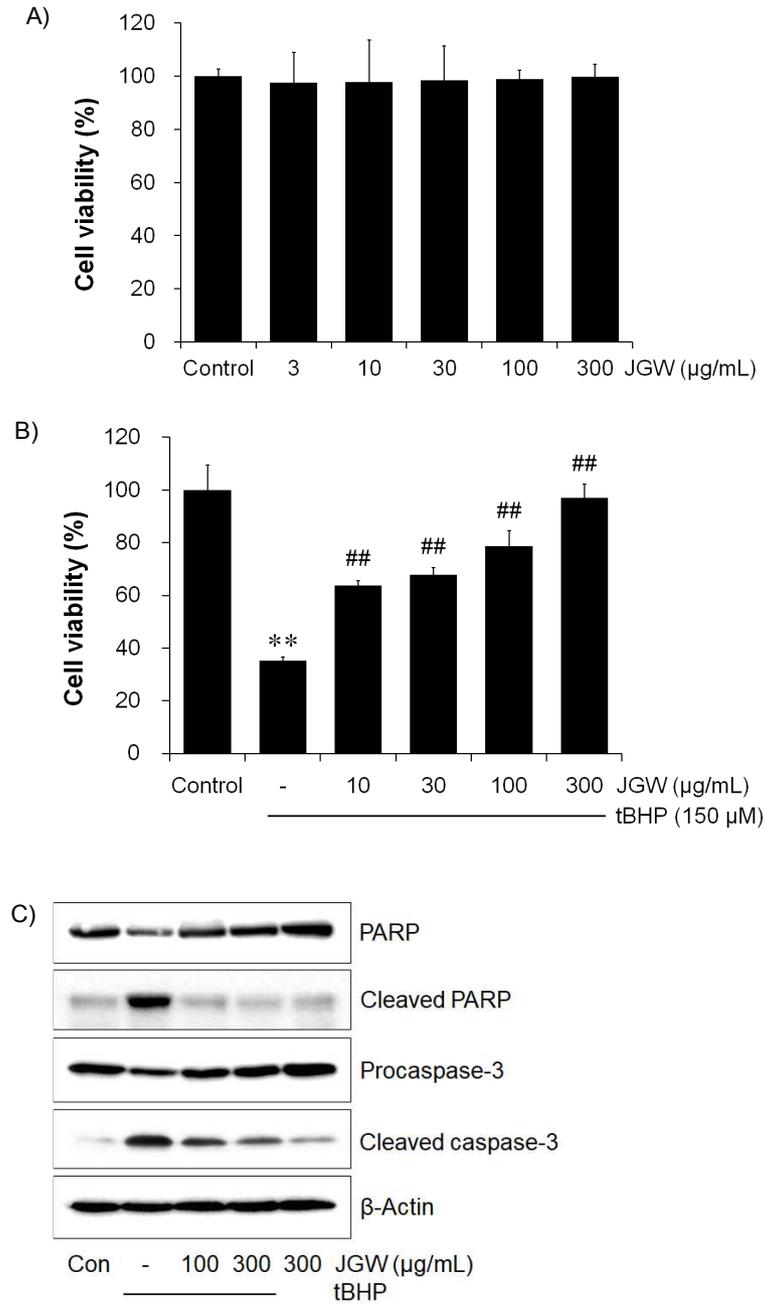
### III. 실험 결과

#### 1. 素馨花 열수 추출물의 tBHP 유도 apoptosis에 대한 간세포 보호 효능

素馨花 열수 추출물(JGW)의 세포 보호 효과를 알아보기에 앞서 JGW의 세포독성 여부를 HepG2 간세포에 3-300  $\mu$ g/mL의 JGW를 12시간 동안 처리한 다음, 세포 생존율의 변화를 측정하였다. MTT 측정 결과, 3-300  $\mu$ g/mL JGW의 처리는 control 세포군의 세포 생존율과 비교하여 통계적으로 유의한 변화가 일어나지 않았다(Fig. 1A). 그러므로 JGW는 300  $\mu$ g/mL까지 HepG2 간세포에 대한 독성이 없음을 확인하였고, 이후 모든 실험에서는 300  $\mu$ g/mL 이하 농도의 JGW를 처리하여 JGW의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효능을 조사하였다. JGW가 tBHP 유도 세포 독성에 대한 보호 효과가 있는지를 조사하기 위하여 10-300  $\mu$ g/mL JGW를 전처리한 HepG2 간세포에 150  $\mu$ M tBHP를 12시간 동안 처리하였다. tBHP 단독 처리군은 control 세포군과 비교하여 세포 생존율이 유의하게 감소되었다( $P < 0.01$ ). 하지만, 10-300  $\mu$ g/mL의 JGW 전처리는 농도의존적으로 tBHP에 의해 감소된 세포 생존율을 증가시켰다( $P < 0.01$ , Fig. 1B). 또한, JGW가 tBHP에 의하여 유도된 apoptosis의 억제를 통하여 세포 보호 효과가 있는지 조사하기 위하여 apoptosis 관련 단백질들의 발현 변화를 면역화학방법으로 분석하였다. 12시간 동안의 tBHP 처리는 control 세포군과 비교하여 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 단백질의 발현을 통계적으로 유의미하게 증가시켰다( $P < 0.01$ ). 하지만, JGW 전처리는 tBHP에 의하여

증가된 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 단백질의 발현을 현저히 감소시켰다( $P < 0.01$ , Fig. 1C, D, E). 또한, 300  $\mu\text{g/mL}$  JGW의 단독 처리는 control

세포군과 비교하여 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 단백질들의 발현에 차이가 없었다(Fig. 1D, E).



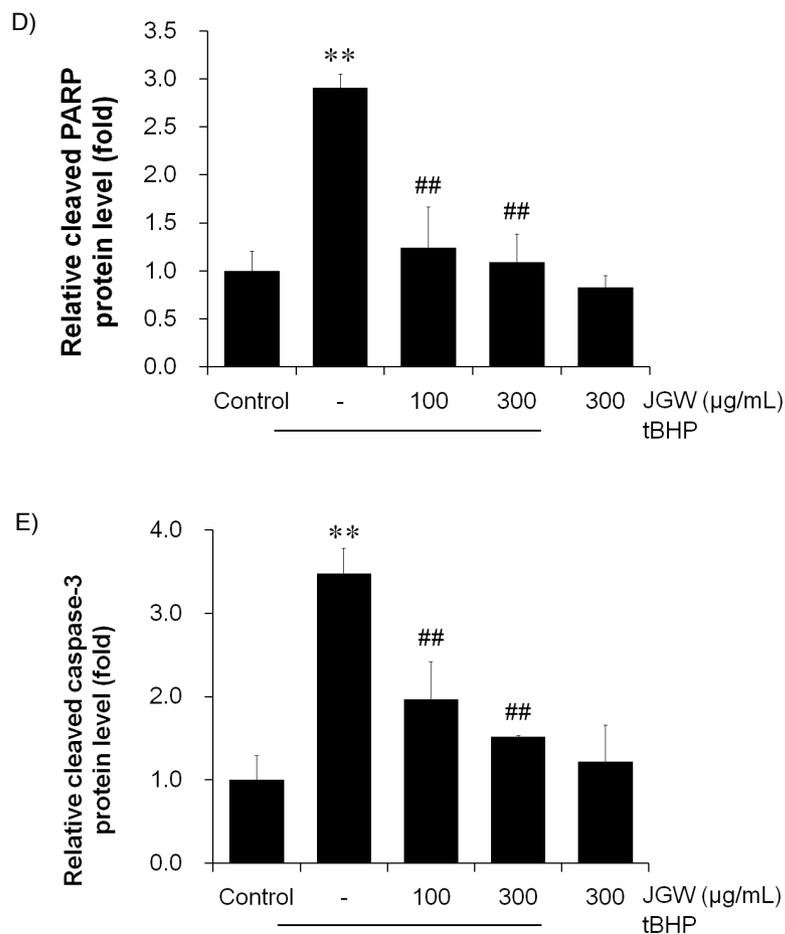


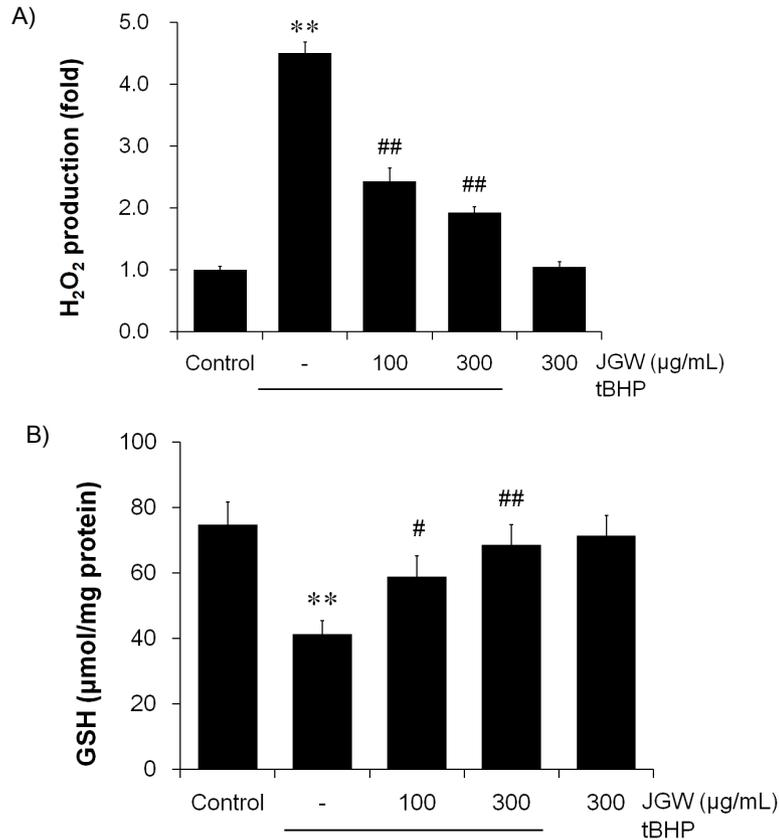
Fig 1. JGW suppressed tBHP-induced apoptosis in HepG2 cells. (A) Effect of JGW on viability of HepG2 cells. To examine cytotoxicity of JGW, HepG2 cells were treated with 3–300  $\mu\text{g/mL}$  of JGW for 12 h. Relative cell viability was determined by MTT assay. (B) Effect of JGW on tBHP-induced cytotoxicity. HepG2 cells were pre-treated with 10–300  $\mu\text{g/mL}$  of JGW for 1 h and subsequently exposed to 150  $\mu\text{M}$  of tBHP for 12 h. (C) Effect of JGW on tBHP-induced apoptosis. Cells were treated with JGW and tBHP. Expression of apoptosis-related proteins was determined by immunoblot analysis. Equal protein loading was verified by  $\beta$ -actin immunoblotting. (D, E) Densitometric analysis. Scanning densitometry was conducted to compare changes on cleaved PARP and cleaved caspase-3 expression. Results represent mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (significant vs untreated control cells, \*\* $P < 0.01$ ; significant vs tBHP-treated cells, ## $P < 0.01$ ).

## 2. 素馨花 열수 추출물의 tBHP 유도 산화적 스트레스에 대한 제어 효능

JGW가 산화적 스트레스의 제어를 통해 tBHP 유도 apoptosis에 대한 보호 기능을 갖고 있는지를 조사하기 위해 먼저 JGW 전처리에 의한 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성의 변화를 관찰하였다. HepG2 세포에서 12시간 동안의 tBHP 처리는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성이 control 세포군과 비교하여 유의미하게 증가되었다( $P < 0.01$ ). 하지만, 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 JGW 처리 농도에 의존적으로 유의미하게 제어하였으며( $P < 0.01$ ), HepG2 세포에 300  $\mu\text{g/mL}$  JGW의 단독 처리는 control 세포군과 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성에 변화가 없었다(Fig. 2A). 또한, 12시간 동안의 tBHP 처리는 세포 내 환원형 GSH 함량을 control 세포군과 비교하여 유의미하게 감소시켰으며( $P < 0.01$ ), 100과 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는 tBHP에 의하여 감소된 환원형 GSH를 각각 유의미하게 증가시켰다( $P < 0.05$

for 100  $\mu\text{g/mL}$ ;  $P < 0.01$  for 300  $\mu\text{g/mL}$ , Fig. 2B) 더욱이 300  $\mu\text{g/mL}$  JGW의 단독 처리에 의한 환원형 GSH 함량의 비율은 control 세포군과 비교하여 유의미한 변화는 나타나지 않았다.

HepG2 세포에 12시간 동안의 tBHP 처리는 미토콘드리아 막전위의 저하를 나타내는 낮은 rhodamine123 형광 강도를 가지는 세포의 비율(R1 fraction)을 control 세포군과 비교하여 유의미하게 증가시켰으며( $P < 0.01$ ), 100과 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는 R1 fraction의 세포 비율을 유의미하게 감소시켰다( $P < 0.01$ , Fig. 2C). 300  $\mu\text{g/mL}$  JGW의 단독 처리에 의한 R1 fraction의 비율은 control 세포군과 비교하여 유의미한 변화가 나타나지 않았다. 그러므로 상기 결과는 JGW가 tBHP에 의하여 증가된 산화적 스트레스를 제어하여 간세포 보호 효과가 있음을 나타낸다.



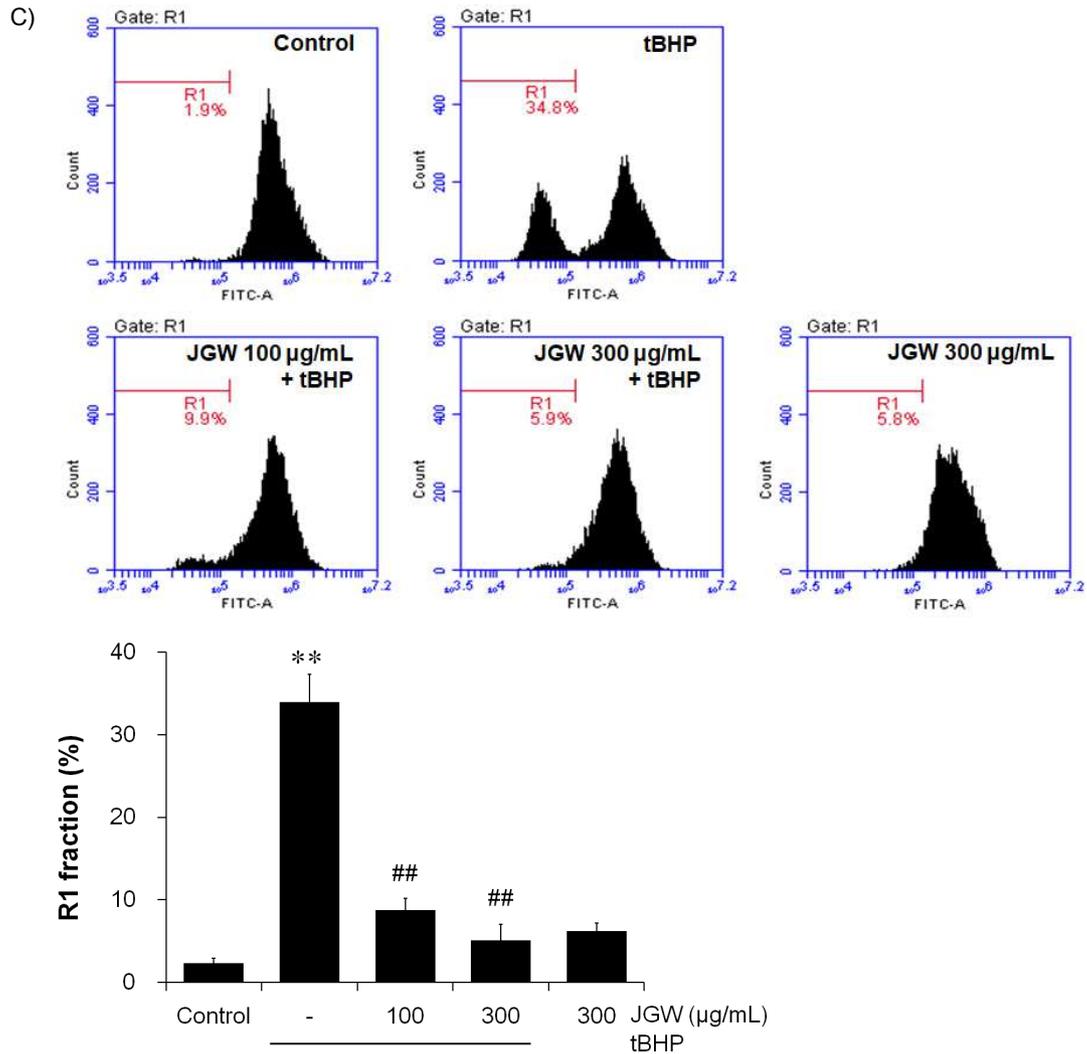


Fig. 2. JGW prevented tBHP-induced oxidative stress. (A)  $H_2O_2$  production, (B) reduced GSH contents, and (C) mitochondrial membrane potentials were determined after HepG2 cells had been treated with JGW and tBHP. Cellular population showing low rhodamine123 intensities (R1 fraction) was presented as percentage of the total cell analyzed (C). Data represent mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (significant vs untreated control cells,  $**P < 0.01$ ; significant vs tBHP-treated cells,  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$ ).

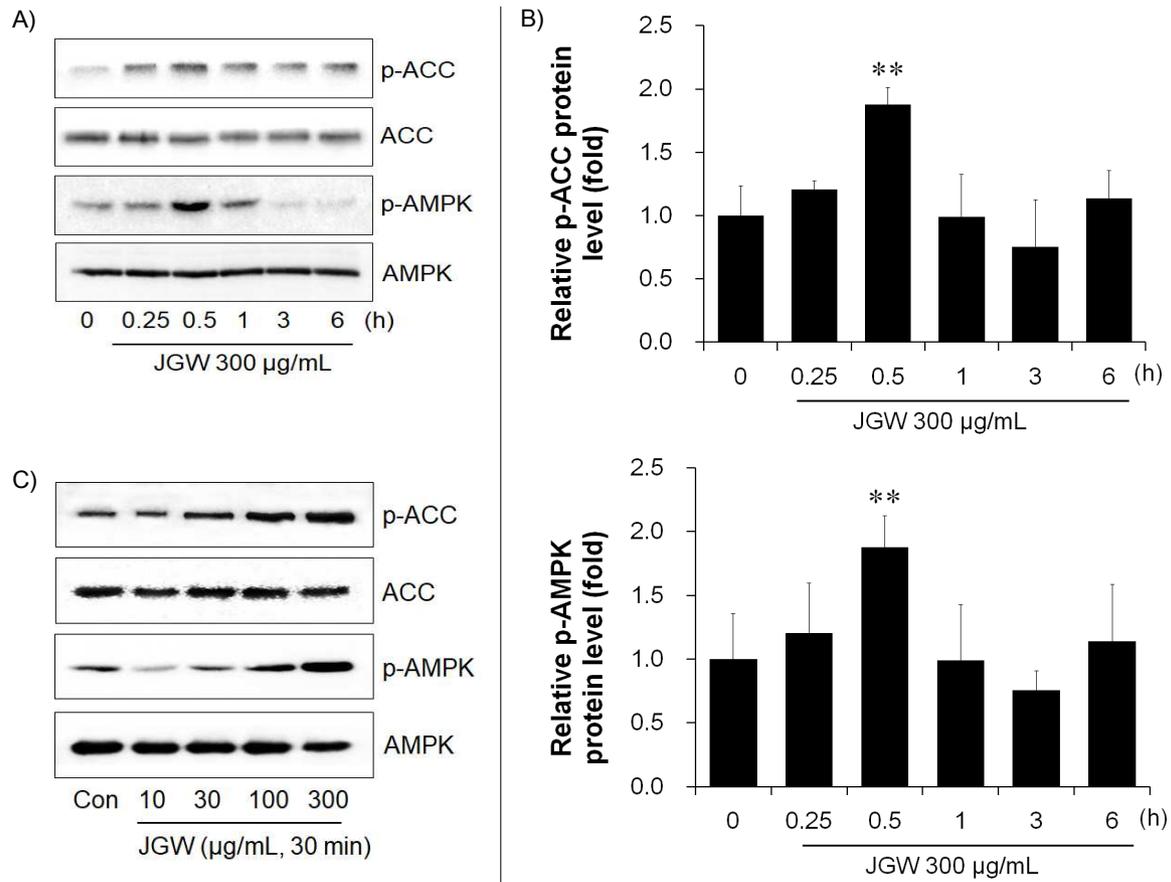
### 3. 素馨花 열수 추출물의 AMPK 활성화를 통한 간세포 보호 효과

JGW가 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호하는 과정에 AMPK의 활성화가 관여하는지 관찰하기 위하여 HepG2 세포에 300  $\mu$ g/mL의 JGW를 처리하여, JGW 처리 시간에 따른 AMPK의 인산화를 조사한

결과, JGW 처리 0.25, 0.5, 1, 3, 6 시간 후, AMPK의 인산화는 30분에서 control 세포군과 비교하여 AMPK의 인산화가 가장 많이 증가하였으며, 유의미한 결과를 도출하였고( $P < 0.01$ ), 30분 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 ACC의 인산화도 비슷한 결과를 나타내었다( $P < 0.01$  for 0.5 h, Fig. 3A,

B). 또한, 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호하는 과정에서 최적의 JGW 농도를 관찰하기 위하여 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 30분동안 처리한 결과, AMPK의 인산화는 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 control 세포군과 비교하여 AMPK의 인산화가 증가하였고, 유의미한 결과를 얻었다( $P < 0.05$  for 100  $\mu\text{g/mL}$ ;  $P < 0.01$  for 300  $\mu\text{g/mL}$ , Fig. 3C & D). 또한, ACC의 인산화도 비슷한 양상을 나타내었다( $P < 0.05$  for 30  $\mu\text{g/mL}$ ;  $P < 0.01$  for 100 & 300  $\mu\text{g/mL}$ , Fig. 3C & D). 더 나아가 JGW에 의한

AMPK 인산화가 JGW의 간세포 보호에 관여하는지 알아보기 위하여 AMPK의 화학적 억제제인 compound C를 전처리한 후, 300  $\mu\text{g/mL}$  JGW와 tBHP를 처리하여 세포 생존율의 변화를 조사한 결과, tBHP 유도 세포 독성에 대한 JGW의 세포 보호 효능이 compound C 전처리에 의하여 유의미하게 억제됨을 확인하였다( $P < 0.01$ , Fig. 3E). 그러므로 상기의 결과들은 JGW가 AMPK의 활성화를 통하여 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호할 수 있음을 시사한다.



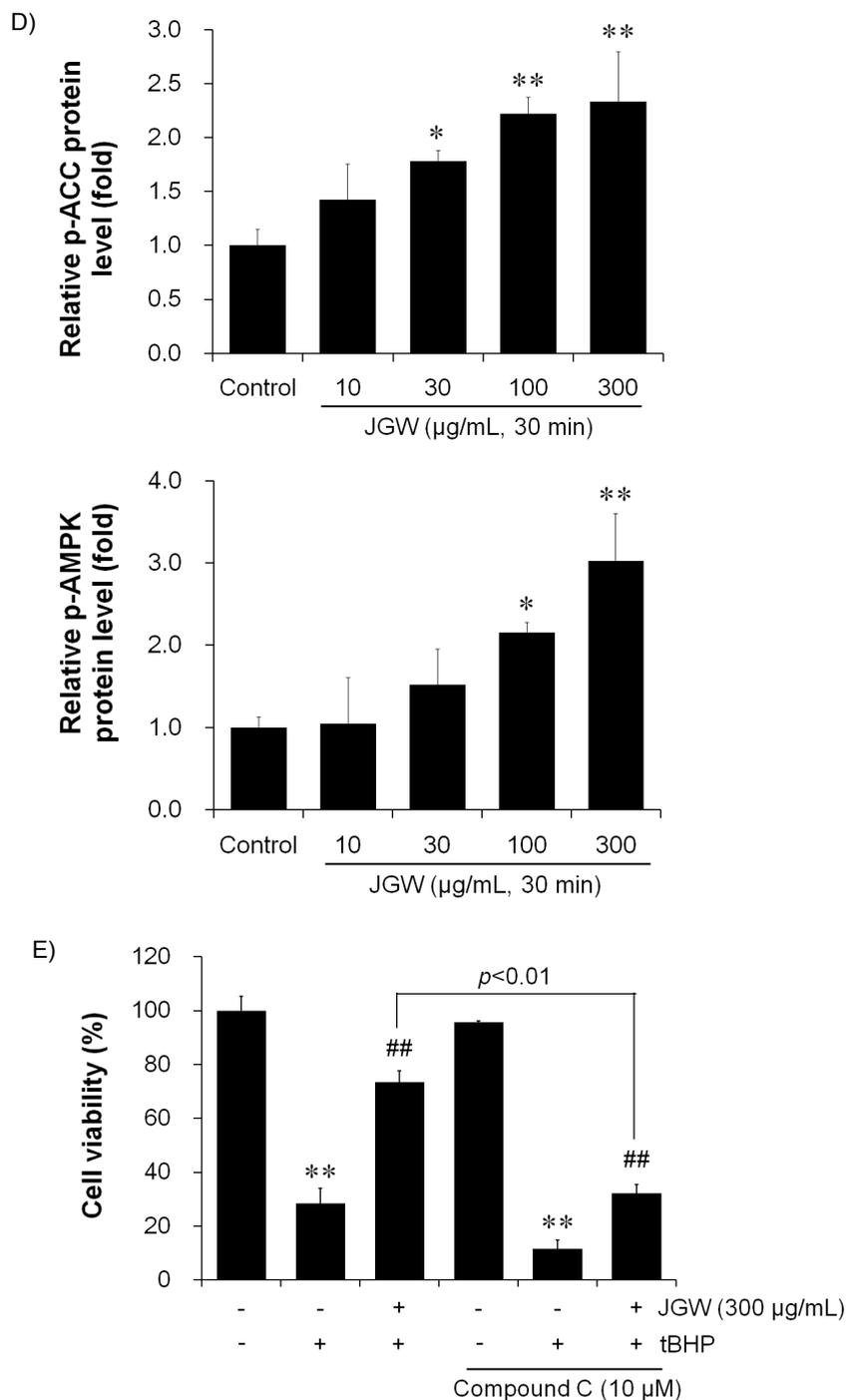


Fig. 3. JGW protected HepG2 cells from oxidative stress through AMPK activation. (A) AMPK and ACC phosphorylation by JGW. Whole cell lysates prepared from HepG2 cells that had been incubated with 300 μg/mL of JGW for 0.25–6 h were immunoblotted for phosphorylated AMPK and ACC. (B) Relative band intensity of phosphorylated AMPK and ACC was quantified by scanning

densitometry. (C) AMPK and ACC phosphorylation by JGW. Whole cell lysates prepared from HepG2 cells that had been incubated with 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/mL}$  of JGW for 0.5 h were immunoblotted for phosphorylated AMPK and ACC. (D) Relative band intensity of phosphorylated AMPK and ACC was quantified by scanning densitometry. (E) Role of AMPK on JGW-mediated cytoprotection. HepG2 cells were pre-treated with 10  $\mu\text{M}$  compound C for 1 h and subsequently exposed to JGW and tBHP. Relative cell viability was determined by MTT assay. Results represent mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (significant vs untreated control cells, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; significant vs tBHP-treated cells, ## $P < 0.01$ ).

#### IV. 고찰

素馨花(*Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*)는 중국에서 관절염, 간염, 십이지장염, 결막염, 위염 및 설사 치료를 위한 전통 또는 민간 요법으로 사용된다<sup>17)</sup>. 또한, 素馨花의 性은 平하고 無毒하며, 간염을 치료하고, 간경화의 간 부위 통증을 치료하며, 흉협 부위의 부적감, 심위의 기통, 하리복통을 치료한다<sup>18)</sup>. 하지만, 항산화 효능에 관련된 분자적 기전에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 HepG2 간세포주를 이용하여 素馨花 열수 추출물(JGW)의 간세포 보호 활성 및 그 분자기전을 연구하고자 하였다.

과산화 유기화합물인 tBHP는 HepG2 세포주에서 활성산소종의 증가, 환원형 GSH의 고갈 및 미토콘드리아 막전위 저하를 통하여 apoptosis를 유도할 수 있다<sup>8-10)</sup>. 본 연구의 결과, HepG2 세포에서 12시간 동안의 tBHP 처리는  $\text{H}_2\text{O}_2$  생성이 control 세포군과 비교하여 유의미하게 증가되었다 (Fig. 1B). 하지만, 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는  $\text{H}_2\text{O}_2$  생성을 JGW 처리 농도에 의존적으로 유의미하게 제어하였다 (Fig. 2A). 또한, tBHP 처리는 세포 내 환원형 GSH 함량을 control 세포군과 비교하여 유의미하게 감소시켰으며, 100과 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는 tBHP에 의하여 감소된 환원형 GSH를 각각 유의미하게 증가시켰다 (Fig. 2B). 더 나아가 HepG2 세포에 12시간 동안의 tBHP 처리는 미토콘드리아 막전위의 저하를 나타내는 낮은 rhodamine123 형광 강도를 가지는 세포의 R1 fraction을 control 세포군과 비교하여 유의미하게 증가시켰으며, 100과 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는 R1 fraction의 세포 비율을 유의미하게 감소시켰다 (Fig. 2C). 이를 종합적으로 고려해 보면, JGW가 tBHP에 의하여 증가된 산화적

스트레스를 제어하여 간세포를 보호하는 효능이 있음을 시사한다. 한편, tBHP에 의하여 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 단백질이 유의미하게 증가하였다. 이는 tBHP가 intrinsic pathway의 활성화로 apoptosis를 유도함을 의미한다. 하지만, JGW 전처리(100 & 300  $\mu\text{g/mL}$ )는 tBHP에 의하여 증가된 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 단백질의 발현을 유의미하게 감소시켰다 (Fig. 1C, D and E). 이는 JGW가 intrinsic pathway의 불활성화로 apoptosis를 제어함을 시사한다. HepG2 세포에 10-300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 전처리는 tBHP에 의한 세포 사멸을 농도 의존적으로 유의미하게 억제하였으며, 더불어 JGW가 tBHP에 의하여 유도되는 산화적 스트레스 (활성산소종의 증가, 환원형 GSH의 고갈, 미토콘드리아 막전위 저하)의 억제를 통하여 apoptosis를 제어할 수 있음을 제시한다. 상기 실험을 통하여 JGW의 항산화능을 *in vitro* 수준에서 증명하였다. 추후, JGW의 주요 활성 compounds의 항산화 효능 실험과 *in vivo* 동물실험 등의 후속 연구가 요구된다.

AMPK는 산화 스트레스에 반응하여 세포 생존, 에너지 항상성 및 세포사멸에 중요한 역할을 한다<sup>5,11)</sup>.

조절 역할은 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside를 포함한 AMPK 활성화제에 의한 세포 생존력의 증가로 입증된다<sup>24)</sup>. 또한, AMPK는 세포 에너지 상태를 감지하고 대사 경로를 조절하는 마스터 조절자이다<sup>11)</sup>. 간에서 활성화된 AMPK는 ACC의 인산화를 통해 지방산 산화를 촉진하고, 스테롤 조절요소 결합 protrein-1c 발현의 감소를 통해 중성지방 축적을 억제한다<sup>11,25)</sup>. JGW가 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호하는 과정에 AMPK의 활성화가 관여하는지를 조사한 결과, AMPK의 인산화는 30분에서 control 세포군과 비교하여

AMPK의 인산화가 가장 많이 증가하였으며, 유의미한 결과를 도출하였고, 30분 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 ACC의 인산화도 비슷한 결과를 나타내었다 (Fig. 3A and B). 또한, 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호하는 과정에서 최적의 JGW 농도를 관찰하기 위하여 각각 30분동안 실험을 한 결과, AMPK의 인산화는 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 control 세포군과 비교하여 AMPK의 인산화가 증가하였고, 유의미한 결과를 얻었다 또한, ACC의 인산화도 비슷한 양상을 나타내었다 (Fig. 3C and D). 이는 AMPK와 ACC의 인산화가 30분 동안의 JGW 배양에서 그리고 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 JGW 농도에서 최적 상태임을 제시한다. 더 나아가 JGW에 의한 AMPK 인산화가 JGW의 간세포 보호에 관여하는지 알아보기 위하여 AMPK의 화학적 억제제인 compound C를 전처리한 후, 300  $\mu\text{g/mL}$  JGW와 tBHP를 처리하여 세포 생존율의 변화를 조사한 결과, tBHP 유도 세포 독성에 대한 JGW의 세포 보호 효능이 compound C 전처리에 의하여 유의미하게 억제됨을 확인하였다 (Fig. 3E). 그러므로 상기의 결과들은 JGW가 AMPK의 활성화를 통하여 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호할 수 있음을 시사한다.

## V. 결론

산화적 스트레스에 대한 素馨花 열수 추출물(JGW)의 간세포(HepG2) 보호 효능 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HepG2 세포에 10-300  $\mu\text{g/mL}$  JGW의 전처리는 tBHP에 의해 유도된 세포독성을 농도 의존적으로 억제하였으며, apoptosis와 관련된 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 단백질의 발현을 억제하였다.
2. HepG2 세포에 JGW의 전처리는 tBHP에 의해 유도된  $\text{H}_2\text{O}_2$  생성 증가, 환원형 GSH 고갈 및 미토콘드리아 막 전위 저하를 제어하였다.
3. HepG2 세포에서 JGW 처리(30분 배양 및 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도)에 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰으며, AMPK 화학적 억제제인 compound C의 처리는 JGW의 세포 보호 효능을 억제하였다.

## 감사의 글

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No. 2018R1A5A2025272) and the Convergence of Conventional Medicine and Traditional Korean Medicine R&D Program funded by the Ministry of Health and Welfare through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI) (Grant No. HI15C0185).

## References

1. Neuzil J, Rayner BS, Lowe HC, Witting PK. Oxidative stress in myocardial ischaemia reperfusion injury: a renewed focus on a long-standing area of heart research. *Redox Rep.* 2005;10(4):187-97.
2. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2006;1761(4):385-91.
3. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004;114(2):147-52.
4. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- $\alpha$  apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2001;276(15):2035-40.
5. Shin SM, Kim SG. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1,2-dithiole-3-thione congeners. *Mol Pharmacol.* 2009;75(1):242-53.
6. Ko HL, Jung EH, Jung DH, Kim JK, Ku SK, Kim YW, et al. Paeonia japonica root extract protects hepatocytes against oxidative stress through inhibition of AMPK-mediated GSK3 $\beta$ . *J Funct Foods.* 2016;20:303-16.
7. Kim JA, Kang YS, Kim YO, Lee SH, Lee YS. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the tert-butyl hydrogenperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells. *Exp Mol Med.* 1998;30(3):137-44.



8. Moon SY, Lee JH, Choi HY, Cho IJ, Kim SC, Kim YW. Tryptanthrin protects hepatocytes against oxidative stress via activation of the extracellular signal-regulated kinase/NF-E2-related factor 2 pathway. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(10):1633-40.
9. Park SM, Lee JR, Ku SK, Cho IJ, Byun SH, Kim SC, et al. Isoliquiritigenin in licorice functions as a hepatic protectant by induction of antioxidant genes through extracellular signal-regulated kinase-mediated NF-E2-related factor-2 signaling pathway. *Eur J Nutr.* 2016;55(8):2431-44.
10. Kim SC, Lee JR, Park SJ. Role of 6-shogaol in tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 cells. *Pharmacology.* 2014;93(3-4):137-44.
11. Lage R, Die'guez C, Vidal-Puig A, Lo'pez M. AMPK: A metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med.* 2008;14:539-49.
12. Hardi DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;13(4):251-62
13. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med.* 2016;48(7):e245.
14. Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. *Mol Cell Biol.* 2016;36(14):1931-42.
15. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biol.* 2000;29(3-4):323-33.
16. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26087-124.
17. Zhao GQ, Yin ZF, Dong JX. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(2):265-8.
18. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. The encyclopedia of oriental herbal medicine (Vol. II), Jungdam Publisher, Seoul, 2004:2468.
19. Zhao GQ, Yin ZF, Dong JX. A new secoiridoid from the flowers of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Yao Xue Xue Bao.* 2008;43(5):13-7.
20. Zhao GQ, Dong JX. Triterpenoid saponins from flower bud of *Jasminum officinale* var. *grandiflorum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2008;33(1):38-42.
21. Zhao GQ, Yin ZF, Liu YC, Li HB. Iridoid glycosides from buds of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Yao Xue Xue Bao.* 2011;46(10):1221-4.
22. Zhao GQ, Xia JJ, Dong JX. Glycosides from flowers of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Yao Xue Xue Bao.* 2007;42(10):1066-9.
23. Teerarak M, Laosinwattana C, Charoenying P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresour Technol.* 2010;101(14):5677-84.
24. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes.* 2002;51(1):159-67.
25. 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.