

Original Article

夜關門의 포도당 독성에 대한 세포 보호 효과

최정식, 조충식, 김철중
대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

Cytoprotective Effect of *Lespedeza Cuneata* Extract on Glucose Toxicity

Jeong-Sik Choi, Chung-Sik Cho, Cheol-Jung Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objective: Production of ROS from glucose toxicity results in injury of pancreatic β -cells in diabetes models. This study was undertaken to examine the influence of *Lespedeza Cuneata* extract (LCE) on cytoprotective effects on glucose toxicity, insulin secretion and gene expression in RIN-m5F cells.

Methods: First, we measured LCE's antioxidant activity by DPPH free radical-scavenging activity and SOD activity. After the various concentrations of LCE were added to the RIN-m5F cells, we measured cell viability with glucose stimulation by MTT assay and glucose-stimulated insulin secretion. We analyzed gene expression with Agilent whole mouse genome 44K oligo DNA microarray and searched for related pathways in KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Lastly we measured INS-1, INS-2, INS-R, IRS-1, IRS-2, IRS-3, GLP-1R, and GLP-2R mRNA expression by real time RT-PCR.

Results: Free radical-scavenging activity, SOD activity and insulin secretion increased dependent on LCE concentration, but LCE did not show considerable cytoprotective effect on RIN-m5F cells. More than twice expressed gene was 6362 in Oligo DNA chip. In KEGG, the most related pathway was the metabolic pathway. In the insulin signaling pathway, up expressed genes were Irs1, Mapk8, Akt1, and Lipe and down expressed genes were Rhoq, Fbp2, Prkar2b, Gck, and Prkag1. In real time RT-PCR, IRS-2, and IRS-3 expression increased significantly compared to the control group on LCE 12 μ g/ml concentration and GCK expression decreased significantly compared to the control group.

Conclusions: These results show that LCE encourages insulin secretion and insulin metabolism by complicated gene mechanisms. Further mechanism study and clinical study seem to be necessary about *Lespedeza Cuneata*.

Key Words : *Lespedeza Cuneata* extract, RIN-m5F cells, glucose toxicity, gene expression, microarray, KEGG

서론

당뇨병에서 만성적인 고혈당 상태는 췌장의 베타 세포를 포함한 여러 기관에 구조적, 기능적 독성 작용을 일으키게 된다¹⁾.

췌장 소도 베타 세포가 장기간 고혈당에 노출되

어 인슐린 mRNA 및 인슐린 유전자 전사인자, 인슐린 분비능 등이 감소하는 것을 포도당 독성(glucose toxicity)이라고 하며^{2,3)}, 이러한 포도당 독성은 포도당 대사 과정에서 reactive oxygen species(ROS)의 생성을 증가시키고, 이로 인한 산화스트레스가 세포 기능을 저하시켜 나타나는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

• Received : 5 April 2010 • Revised : 14 June 2010 • Accepted : 16 June 2010
• Correspondence to : 조충식(Chung-Sik Cho)
충남 천안시 서북구 두정동 621번지 대전대학교 부속천안한방병원 신계내과
Tel : +82-41-521-7531, Fax : +82-41-521-7007, E-mail : choo1o2@chol.com

췌장 소도 세포는 항산화효소의 세포 내 발현이 아주 낮고, 여러 세포성 스트레스에 의한 항산화효소 발현의 적응이 이루어지지 않아 ROS에 의한 세포 독성에 특히 민감한 것으로 보고되고 있다⁴⁾.

최근에는 항산화효소를 과발현시킨 경우 ROS에 의한 췌장 소도 세포 손상을 유의하게 억제할 수 있었다는 보고⁶⁾와 항산화계의 투여가 포도당 독성을 일부 방지할 수 있다는 보고⁷⁻⁹⁾가 있었으며, 항산화 효과가 있는 본초^{10,11)}와 처방¹²⁻¹⁴⁾이 혈당 강하에 유의한 효과가 있음이 보고되어, 항산화 효과가 있는 약물이 포도당 독성으로부터 베타 세포의 보호와 인슐린 분비 증가에 일정한 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

夜關門(Lespedeza Cuneata G. Don)은 콩과의 여러해살이 식물로 비수리, 삼엽초 등의 이름으로 불리우며, 性은 涼하고, 味는 苦辛하다¹⁵⁾. 임상에서는 遺精, 遺尿, 白濁, 白帶, 喘息, 胃痛, 勞傷, 小兒疳積, 泄瀉, 打撲傷, 視力減退, 赤目, 급성 유선염의 치료에 활용하며, 민간에서는 당뇨병에 이용한다고 알려져 있다¹⁵⁾. 최근 열수 추출물과 에탄올 추출물의 항산화 효과¹⁶⁾와 동물 실험을 통한 혈당 강하 효과¹⁷⁾가 보고되었고, 야관문 메탄올 추출물이 RIN-m5F 세포에서 H₂O₂를 이용한 산화 스트레스에 대하여 세포 보호 효과가 높은 것으로 보고되었다¹⁸⁾.

그러나 야관문 열수 추출물의 베타 세포 보호 효과와 인슐린 분비에 미치는 영향 및 관련 유전자 발현에 대한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 야관문의 포도당 독성에 대한 베타 세포의 보호 효과와 인슐린 분비에 미치는 영향을 알기 위하여, RIN-m5F 세포에서 포도당 자극 후 야관문 열수 추출물 투여로 변화된 세포 생존율과 인슐린 분비량을 측정하였으며, DNA chip을 활용하여 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 또한 DNA chip에서 검출된 유전자의 작용을 알기 위해 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)를 이용하여 관련 Pathway를 검색하였고, real time RT-PCR법을 이용하여 인슐린 관련 유전자의 발현 정도를 분석하여 의미 있는 결과를 얻었기에 이에

보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 夜關門(Lespedeza Cuneata G. Don, LC)은 경북 영천에서 생산되어 건조된 것으로, 대전광역시 중구 백제당에서 구입하였다.

2) 시약 및 세포주

Cell culture는 FBS(Gibco-BRL, U.S.A.), RPMI1640 (Gibco-BRL, U.S.A.), 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 50µM 2-mercaptoethanol, D-PBS dulbecco's phosphate buffered saline(GIBCO BRL Life Technology, U.S.A.), potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, trypsin-EDTA (GIBCO BRL), p-nitrophenyl a-D-glucopyranoside, PIPES buffer(0.1M, pH 6.8), isopropanol 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), NaOH, dimethyl sulfoxide(DMSO), isopropyl alcohol은 Sigma(U.S.A) 제품을 사용하였고, trizol(Life Technologies, U.S.A.), superscript II reverse transcriptase(Life Technologies, U.S.A.), iQ SYBR green supermix(Bio-Rad Laboratories, Inc., U.S.A.), 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. Rat 기원 RIN-m5F 인슐린 종양 세포는 ATCC (Manassas, U.S.A.)에서 구입하였다.

3) 기기

열탕추출기(대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(model FDU-540, Eyela, Japan), CO₂ incubator(Forma Scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision Scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision Scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co., Korea), spectr-

ophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), homogenizer(OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.), C18 HPLC column(Hypersil, U.S.A.), HPLC(Shimadzu, Japan), microplate reader (Molecular Devices, U.S.A.), SOD assay kit (Dojindo, Japan)를 사용하였고, rat insulin radioimmunoassay (RIA) kit(Linco Research, Inc., U.S.A.)는 acetonitrile (Merck사, HPLC용)을 사용하였다.

DNA chip은 Agilent mouse whole genome 44K oligo DNA microarray(Agilent Co., U.S.A.)를 이용하였으며, DNA chip을 분석하는 과정에서 Agilent's 2100 bioanalyzer system(Agilent Co., U.S.A.), Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS (Agilent Co., U.S.A.), Agilent's Gene Expression Hybridization Kit(Agilent Co., U.S.A.), Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit(Agilent Co., U.S.A.), Axon GenePix 4000B scanner(Axon, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

야관문 80 g을 증류수 1,000ml에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였고, 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 7.26g(수거율: 9.075%)의 야관문 열수 추출물(Lespedeza Cuneata Extract, LCE)을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고(-20℃)에 보관하면서, 실험에 필요한 농도로 phosphate buffered saline(PBS)에 희석하여 0.22µm의 필터링 후 사용하였다.

2) 약물의 high performance liquid chromatography(HPLC) 분석

LCE의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C18 HPLC column을 장착한 HPLC를 사용하였다. 전체 분석

시간은 30분으로 이동상의 구성은 초기 5분 동안 H₂O를 흘려주었고, 이후 20분 동안은 acetonitrile gradient를 하여 acetonitrile을 100%까지 올렸으며, 그 상태를 5분간 지속하였다. 214 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료의 양을 확인하였다.

3) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) Free Radical-Scavenging 활성 측정

DPPH는 산화/환원 환경에 따라 색을 띠는 라디칼로 시료의 라디칼 제거능력을 측정 할 수 있다. 시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로, 다양한 농도(1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml)의 LCE를 phosphate buffer에 녹여 처리한 후 100µl에 200mM DPPH 900µl를 shaking한 후에 상온에서 10분간 방치 후에 eppendorf tube에서 96-well plate의 각 well에 분주하여 O.D 517nm에서 측정하였다.

대조군은 phosphate buffer에 DPPH를 shaking하였고, 양성 대조군으로 ethyl ascorbyl ether(EAE)를 사용하여 LCE의 항산화효과를 비교하였다.

Free radical scavenging activity는 아래의 공식으로 측정하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity} = 1 - \left(\frac{\text{Absorbance of test compound}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

4) SOD 활성 측정

96-well plate의 각 well에 다양한 농도(0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml)의 LCE 20µl를 첨가한 후 reagent solution 200µl를 넣은 후 마지막으로 enzyme working solution을 넣어준 후, 37℃에서 20분간 반응시킨다. ELISA reader를 이용하여 O.D 450nm에서 측정하여, SOD activity(inhibition rate, %)를 계산하였다. SOD 활성을 측정하는 nitrobut-tetrazolium(NBT)을 이용한 method는 formazan dye의 물에 대한 난용성과 환원된 xanthine oxidase와의 상호작용하는 단점을 가지고 있어, 본 논문에서는 tetrazolium salt를 이용, SOD에 의한 환원으로 수용

성의 WST-1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 형성하여 SOD assay를 측정하였다. 측정은 SOD Assay kit로 하였다.

5) RIN-m5F 세포의 배양

Rat 기원 인슐린종 세포주인 RIN-m5F 세포는 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 RPMI 1640 Media에서 5% CO₂-95% air, 37°C에서 배양하였다. 배양액은 3~4일 간격으로 교대하였고, 세포들은 trypsin-EDTA로 계대 배양하였다.

6) MTT를 이용한 세포 생존율 측정

배양한 세포를 0.25% trypsin을 사용하여 분리하여 PBS로 3회 세척한 다음 96-multi well에 2 \times 10⁴ cells/well의 세포수가 되도록 분주하였다. 세포는 3일간 FBS가 들어있는 RPMI 배양액에서 LCE를 각각 다양한 농도(2 μ g/ml, 4 μ g/ml, 6 μ g/ml, 8 μ g/ml, 10 μ g/ml, 12 μ g/ml)로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다.

이후 세포 생존율을 MTT 분석법에 의해서 분석하였다. MTT 분석은 배양이 완료된 세포에 50 μ g/ml MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]을 희석 처리하여 반응시킨 후, microplate reader로 570nm에서 측정하였다.

7) RIN-m5F 세포에서의 인슐린 분비 측정

RIN-m5F 세포를 well 당 3.0 \times 10⁵개로 12-well plate에 분주하여 완전배지에서 3일간 배양한 후 다양한 농도의 LCE(2 μ g/ml, 4 μ g/ml, 6 μ g/ml, 8 μ g/ml, 10 μ g/ml, 12 μ g/ml)와 D-PBS를 첨가하여 2일간 배양하였다. 이후 modified Kreb's ringer bicarbonate 완충액(KRBB-HEPES, 134mmol/l NaCl, 4.8mmol/l KCl, 1mmol/l CaCl₂, 1.2mmol/l MgSO₄, 1.2mmol/l KH₂PO₄, 5mmol/l NaHCO₃, 10mmol/l HEPES, 1mg/ml BSA, pH 7.4)으로 2회 세척하고 5mM 또는 20mM의 포도당을 함유한 KRBB- HEPES 완충액으로 바꾸어

1시간 배양한 후, 상층액을 취하여 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다. 분비된 인슐린의 양을 rat insulin RIA kit로 측정하였고, 각 well의 세포 단백질의 농도를 측정하여 각 단위 그램 단백질 당 인슐린 분비량을 계산하였다.

8) LCE 처리 후 RNA 분리 및 확인

RIN-m5F 세포를 100mm dish에 1 \times 10⁶농도로 24시간 배양한 후 대조군(control)은 glucose(20mM)을 처리하고, 실험군에는 glucose(20mM)와 LCE 10 μ g/ml를 처리하였다. 처리한지 48시간 후 배지를 제거한 후 PBS로 2번 세척하였다. 각 100mm dish에 1ml trizol-reagent에 넣고 실온에서 5분간 방치한 후 scrapper로 모아서 세포가 완전히 해리되도록 하고, 상층액에 200 μ l chloroform을 가하여 3분간 반응시킨 후 원심분리 하였다(12,000 \times g, 15분, 4°C). 상층액에 0.5 μ l isoamylalcohol을 가한 후 15분간 상온에서 방치하여 RNA를 침전시킨 후, 75% ethanol을 사용하여 RNA를 세척하고, 건조시켰다. RNase free water인 0.1% DEPC autoclaved DDW 25 μ l에 RNA를 녹인 후 spectrophometer(260/280nm)를 이용하여 정량하고, 1 μ g/ μ l의 RNA를 1% agarosegel에 올린 후 전기 영동하여 RNA의 degradation상태를 확인하였다. 이와 같은 절차로 얻은 최종 RNA 시료를 대상으로 Bioanalyzer 2100을 이용하여 quality check를 실시하고, 실험의 오차를 줄이기 위해 3회 반복 실험을 실시하여 얻은 RNA 시료를 동량 혼합하여 microarray분석에 이용하였다.

9) Oligo DNA microarray

Agilent mouse whole genome 44K oligo DNA microarray를 이용하여 RIN-m5F 세포에서 유전자 발현을 보았다(Table 1,2). Agilent는 합성된 oligonucleotide를 올려 주는 기존의 inkjet 방식과는 달리 하나의 염기(base) 씩 올려 주며 합성해 나가는 방식으로 이러한 과정은 하나의 nucleotide(A, T, G, C)를 계획된 부분에 쏘아 줌으로써 Agilent chip은 완성되게 된다.

Table 1. Experiment & Data Analysis

Experiment & Scan	Chip ID	Agilent rat whole genome 44K
	Starting amount of sample RNA	Each 3 μ g total RNA
	Scanner	Axon Gene Pix 4000B Scanner
Data analysis	Analysis program	Agilent Gene Spring GX 7.3
	Normalization method	Data transformation: set measurement less than 0.01 to 0.01 Per Chip: normalize to 50th percentile Per Gene: normalize to specific samples
	Reliable genes	Filtering for reliable genes : 39,704 genes selected

Table 2. Data Analysis Scheme

RNA sample	Agilent's 2100 Bioanalyzer System을 이용하여 total RNA의 quality를 측정함.
Amplification and labeling	Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS를 이용하여 증폭 및 라벨링 과정을 수행함.
Microarray hybridization	Agilent's Gene Expression Hybridization Kit를 이용하여 수행함.
Microarray wash	Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit를 이용하여 수행함.
Scan and image analysis	Axon Gene Pix 4000B Scanner 및 Feature extraction software를 이용하여 수행함.
Data analysis	Agilent's genespring software를 이용하여 normalization 및 clustering 등을 수행함. Normalization 방법
	- Data transformation: set measurement less than 0.01 to 0.01, signal intensity 값이 0.01 보다 낮은 값은 noise일 가능성이 있으므로 0.01 값으로 보정(adjustment)함.
	Gene selection - Significant genes: normalized ratio 값이 2배 이상 차이를 보이는 probe 만을 선별함.

(1) RNA의 Cy3, Cy5 labelling

RIN-m5F 세포에 대조군(control)은 glucose(20mM)을 처리하고, 실험군에는 glucose(20mM)와 LCE 10 μ g/ml을 처리한 후, 각각에서 추출한 RNA 10~50 μ g에 oligo-dT primer(18mer), reverse transcriptase, dNTP, 0.1M DTT, RNasefree water, 5 \times firststand buffer, Cyanine3-dCTP(또는 Cyanine5-dCTP)를 각기 첨가하여 역전사시켰다.

이때 대조군의 RNA에는 Cyanine3-dCTP(green color, Cy3), 그리고 실험군의 RNA에는 Cyanine5-dCTP(red color, Cy5)를 첨가하여 각기 형광 label시켰다. 이 반응물을 시약을 이용하여 정제한 후 40배 희석하여 260/280nm ratio가 1.5이상에서 실험을 실시하였다.

(2) Hybridization

Denaturation한 cDNA를 Agilent mouse whole

genome 44K oligo DNA chip에 점적한 후, 62 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 혼성화 시켰다. 혼성화한 슬라이드를 2 \times SSC, 0.1% SDS 용액에서 1회, 1 \times SSC 용액에서 1회 세척하고, 마지막으로 0.2 \times SSC에서 세척 후 centrifuge로 건조시켜 분석하였다(Fig. 1).

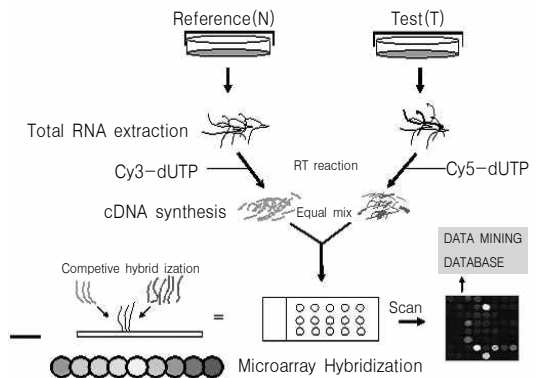


Fig 1. cDNA microarray procedure.

(3) Oligo DNA microarray

Epson lazer scanner를 이용하여 Agilent whole rat genome microarray 44K oligo DNA chip을 스캔하고, 스캔한 이미지를 GenePix pro 4.1 program 를 이용하여 분석하여, 각 개별 유전자에 대한 Cy5/Cy3 ratio 값을 얻었다. 이 때 정확한 intensity값을 위해 spot주위의 background intensity값을 제외한 값으로 계산하였다. Scatterplot에서 spot의 intensity를 전체적으로 고르게 분산시켜 데이터의 확인을 더욱이하게 하기위해 log-transformed intensity을 사용했다.

10) KEGG pathways maps

KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)는 1995년 5월 the Japanese human genome programme 하에 시작된 것으로 <http://kegg.jp>에 접속하여, DNA chip을 통해 발견된 유전자 중 Flags 값이 P로 표시된 유전자와 관련된 pathway를 조사하였다.

Flags는 각 probe의 signal intensity 값이 background 값보다 낮거나, 각 pixel 값의 표준편차가 유의하지 않은 경우는 'A' flag value로 나타나며, 'P' 및 'M'으로 표시된 probe는 칩 분석 결과 값으로 활용할 수 있다.

11) Real time RT-PCR을 이용한 유전자 발현 측정
RIN-m5F 세포를 6-well plate에 분주하여 저농도 포도당(5mM) 배지와 고농도 포도당(20mM) 배지 그리고 LCE을 함유한 배지(6µg/ml, 12µg/ml)에서 48 시간 동안 배양하였다. KRBB-HEPES 완충액으로 2 회 세척하고 1시간 동안 각각 5mM 또는 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 배양한 후, trizol로 총 RNA를 추출하였다. 세포에 1ml의 trizol 용액을 첨가한 후 실온에서 5분 동안 배양한 후 trizol 용액 1ml당 0.2ml의 chloroform을 첨가한 후 4℃에서 15분 동안 12,000×g로 원심 분리하였다. 상층부의 액상 부위를 새로운 튜브에 옮겨 담은 후 0.5ml의 isopropyl alcohol을 첨가하고 실온에서 15 분간 배양한 후 4℃에서 10분간 12,000×g로 다시 원심 분리하였다. Superscript II reverse transcriptase 를 이용하여 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻은 후 iQ SYBR green supermix를 이용하여 beta-actin에 대한 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

각 유전자 발현 정도를 real time RT-PCR을 이용해 측정하였다. 각각의 유전자들의 염기 서열은 Table 3과 같다. 각 sample의 추출된 RNA에 2× SYBR Green Master Mix(Bio-Rad) 25µl와 각각의 유전자들과 10pM forward and reverse primers를 1

Table 3. Sequences of Primer Set used Quantative Real Time RT-PCR

Primers	Foward	Reverse	Tm(°C)	Product size (bp)
Beta-actin, (β-actin)	TCTGAACCTAAGGCCAACCGT	ATGGCATGAGGGAGCGCG	60	198
Insulin 1 (INS-1)	CAAACAGCACCTTTGTGGTCCT	CACAATGCCACGCTTCTGC	60	199
Insulin 2 (INS-2)	CAGCACCTTTGTGGTCTCACT	ATCCACGATGCCGCGCTTC	60	198
Insulin receptor (INS-R)	CCGAAAGCGAAGATCCCTTGAA	ATGCCTGCAGCTCAATGC	60	200
Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)	AGAACGAGAAGAAGTGGCGGCA	TGCAGCTGCAGAAGAGCC	60	199
Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)	AGCGAGAAGAAGTGGGAAGAGCA	TGACCAAGTCGGTGAGTG	60	199
Insulin receptor substrate 3 (IRS-3)	CCATCTGAGGAAGCAGAAGTCC	TGACGATCAGGTGGCGCTG	60	200
Glucokinase (GCK)	ATTGGACCAAGGGCTTCAAGGC	CATTGCAGCCAGTGCCAC	60	198
Glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R)	CACTGCACCAGGAACATACATCC	GCCGCCACGCAGTATTGCA	60	200
Glucagon-like peptide 2 receptor (GLP-2R)	CTTTGTGGGCACCAATCACTTG	TCCCATTTGTGGCCAGCA	60	200

μl씩 첨가하여 각각 50μl 반응이 이루어졌으며 95℃에서 10분 후 30초간 40cycle을 돌린 다음 60℃에서 30초, 72℃에서 30초 동안 반응을 일으켰다. β-actin mRNA을 대조 유전자로 이용하여, target mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다.

12) 통계 분석

실험결과는 means±S.D.로 표시하였다. 통계적 처리는 Student's t-test를 사용하였으며, P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 의미가 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 약물의 HPLC 분석 결과

C18 HPLC를 사용하여 LCE의 수용성 성분을 분석하였고, 앞부분의 수용 성분을 확인하였다(Fig. 2).

2. LCE가 항산화에 미치는 영향

1) DPPH 라디칼 소거 작용에 미치는 영향

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 LCE의 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로 사용한 EAE는 60mM에서 71.76±0.20%, 1000mM에서 83.58±0.20% 등의 소거능을 보여주었고, LCE는

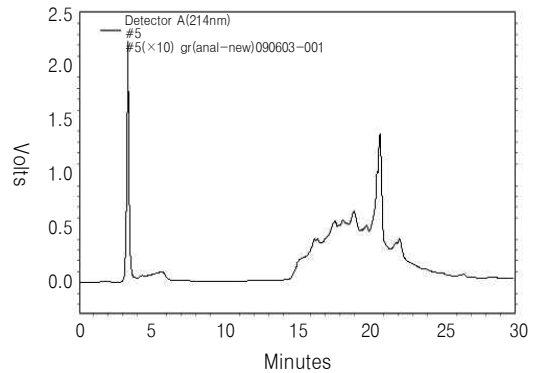


Fig. 2. Analysis of HPLC profile of LCE.

Water extracts were subjected to C18 column chromatography on acetonitrile linear gradient(line) over a 30 min period at a flow rate of 1ml/min. Absorbance was monitored at 214nm.

5μg/ml의 농도에서 23.07± 2.54%, 10μg/ml의 농도에서 27.99±1.39% 등으로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성(p<0.05) 있게 증가한 라디칼 소거 작용을 보여 주었다(Table 4).

2) SOD 활성에 미치는 영향

SOD 활성 측정결과 0.1μg/ml에서 12.29±0.78%에 비하여, 1μg/ml에서는 40.09±2.72 %, 10μg/ml는 44.9±2.27%, 100μg/ml에서는 61.51±1.49%로 대조군에

Table 4. Effect of LCE on DPPH Radical-scavenging Activity

Sample	Concentration	Scavenging effect (%)
Control	-	0
EAE	1000mM	83.58±0.20*
	500mM	82.53±0.14*
	250mM	76.13±0.29*
	120mM	74.54±0.58*
	60mM	71.76±0.20*
LCE	10μg/ml	27.99±1.39*
	5μg/ml	23.07±2.54*
	1μg/ml	1.18±0.15

Free radical scavenging was measured by DPPH. Each group were treated with phosphate buffer and DPPH(control) or EAE(60, 120, 250, 500, 1000mM) and DPPH or LCE(1, 5, 10μg/ml) and DPPH for 10 min. Each value is mean±S.D.(n>3),

*: p<0.05 vs control.

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{Absorbance of test compound}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

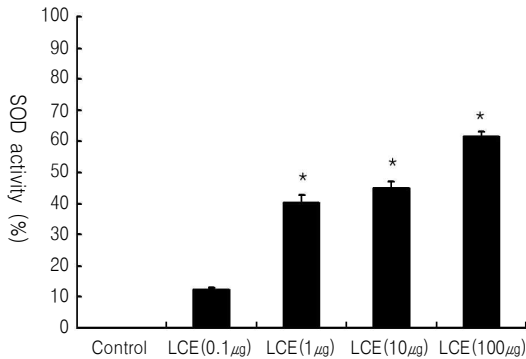


Fig. 3. Effect of LCE on the superoxide dismutase(SOD) activity.

The effect on SOD was tested with LCE(0.1, 1, 10, 100 μg). Date are expressed as % of control and each column represents the mean±S.D. of three determination. *: p<0.05 vs control.

비하여 농도 의존적으로 유의성 있게(p<0.05) 항산화능이 증가하였다(Fig. 3)

3. LCE가 세포 생존율에 미치는 영향

LCE가 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay 로 측정하였다.

저농도 포도당(5mM)의 경우, LCE 농도에 따라 대조군에 비하여 세포의 생존율이 감소하는 경향을 보였으며, 통계적 유의성(P<0.05)은 LCE 12μg/ml에 서만 관찰되었다(Fig. 4).

고농도 포도당(20mM)의 경우, LCE 농도에 따라 대조군에 비하여 세포 생존율이 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

LCE를 함유하지 않은 배지에서 RIN-m5F 세포를 배양한 군(LCE(-))과 LCE 12μg/ml를 함유한 배지에서 RIN-m5F 세포를 배양한 군(LCE(+))에 저농도 (5mM)와 고농도 포도당(20mM) 자극을 가한 후, 세포 생존율을 비교하였다.

저농도 포도당(5mM) 자극에 의한 세포 생존율은 LCE(-)의 경우 100.55±2.97%, LCE(+))에서는 86.36 ±2.35%로 LCE(-)비하여 유의성(p<0.05) 있는 감소 소견이 관찰되었다(Fig. 5).

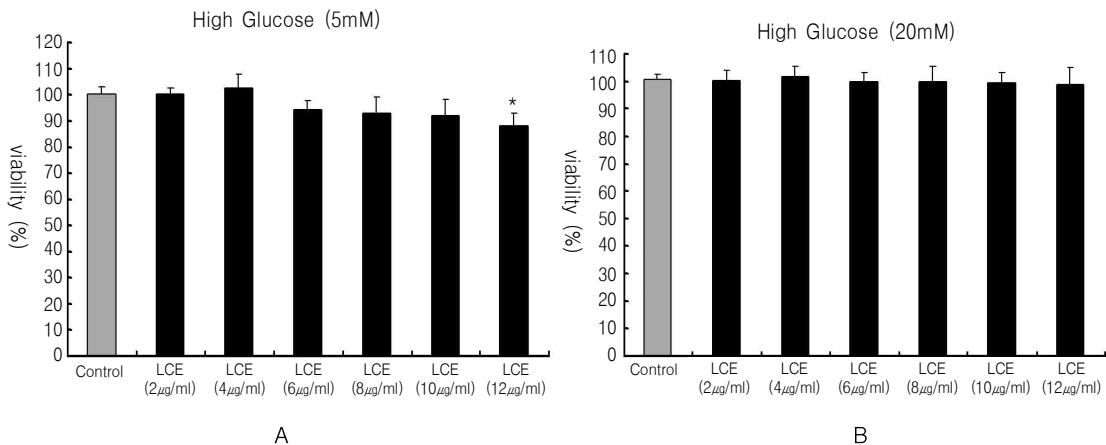


Fig. 4. Additional effects of LCE on viability of RIN-m5F cells determined by MTT assay.

A and B panels are the viability rates with concomitant treatments with LCE and Low Glucose(A) or LCE and High Glucose(B). RIN-m5F cells were treated with LCE for 48hr. The cell viability was measured by MTT assay as described in material and methods.

Date are expressed as % of control and each column represents the mean±S.D. of three determination. *: p<0.05 vs control. A: Addition of Low Glucose(5mM) to RIN-m5F cells in combination with 2~12(μg/ml) LCE on viability of RIN-m5F cells determined by MTT assay.

B: Addition of High Glucose(20mM) to RIN-m5F cells in combination with 2~12(μg/ml) LCE on viability of RIN-m5F cells determined by MTT assay.

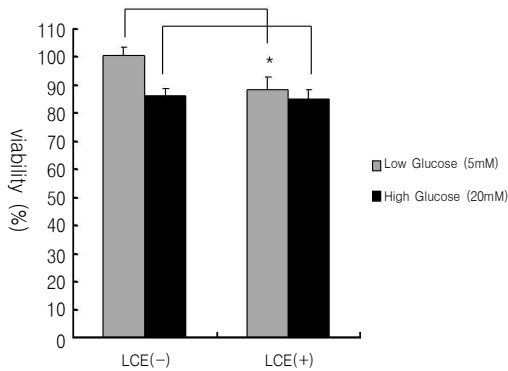


Fig. 5. Additional effects of LCE on viability of RIN-m5F cells determined by MTT assay.

RIN-m5F cells were treated with LCE to 12 μ g/ml for 48hr. The cell viability was measured by MTT assay as described in material and methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm S.D. of three determination. *: p<0.05 vs LCE(-).

고농도 포도당(20mM) 자극에 의한 세포 생존율은 LCE(-)의 경우 88.42 \pm 4.63%이었고, LCE(+)-에서는 85.23 \pm 3.35%로 LCE(-)비하여 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 5).

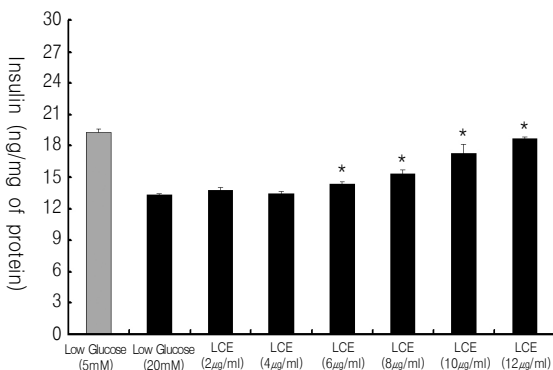


Fig. 6. Effect of LCE on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in RIN-m5F cells.

After the cells were cultured with or without LCE for 2 days, and then cultured in KRBB-HEPES containing 5mM and 20mM glucose for 1 hours. Insulin content was measured from RIN-m5F cells cultured in RPMI 1640 media containing glucose in the LCE 2~12 μ g/ml for 20mM glucose. Insulin amount was normalized by total protein amount in the cell lysates. Values are means \pm S.D. *: P<0.05 vs cell with vehicle in High glucose(20mM).

4. LCE가 인슐린 분비에 미치는 영향

포도당 자극에 의한 인슐린 분비량은 저농도 포도당(5mM)에서 19.32 \pm 0.26 ng/mg protein/1h였고, 고농도 포도당(20mM)에서는 13.00 \pm 0.11ng/mg protein/1h로 나타났다.

고농도 포도당(20mM)에 LCE를 첨가한 실험군에서는 농도 의존적으로 인슐린 분비가 증가하였으며, LCE 6 μ g/ml에서 14.38 \pm 0.15ng/mg protein/1h, LCE 12 μ g/ml에서 18.65 \pm 0.25ng/mg protein/1h 등 LCE 6 μ g/ml 이상에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 증가가 관찰되었다(Fig. 6).

5. Oligo DNA microarray

1) Total RNA 추출의 quality 분석 결과(Fig. 7)

2) Total RNA quality 측정 결과

Agilent 2100 Bioanalyzer에서 제시하는 RIN 값은 migration 및 peak pattern, 28s/18s ribosomal RNA의 비율을 근거로 한 통계적인 수치로서 1~10의 범위를 가지며, 진행생물 total RNA samples의 quality 지표로 사용되고 있다. High quality 시료를 요하는 DNA microarray analysis를 위한 권장 값은 7.0 이상이다(Table 5).

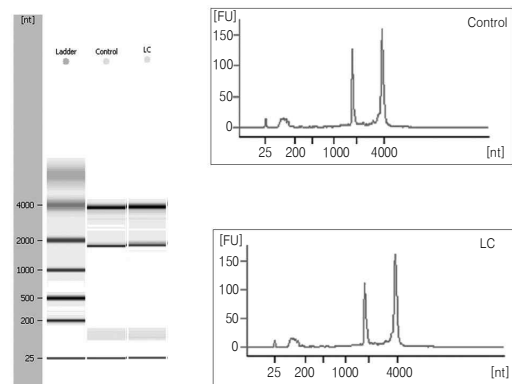


Fig. 7. RIN-m5F cells total RNA quality control(Agilent 2100 Bioanalyzer).

(A): Migration pattern(electrophoretic trace)
(B): Peak pattern(electropherogram)

Table 5. RIN-m5F Cell Line RIN(RNA Integrity Number)

	Ratio(28s/18s)	RIN
sample	2.1	10.0

3) Oligo DNA microarray 이미지

추출된 RNA를 역전사하여 oligo DNA를 합성하고, 대조군에서 발현되는 유전자는 녹색(Cy3), 그리고 실험군(LCE, Arbutin-treated)에서 발현되는 유전자는 빨간색(Cy5)으로 형광 표지하여 mouse oligo DNA microarray chip에 hybridization한 후, 스캐닝한 microarray 이미지가 Fig. 8에 나타나 있다.

4) Normalized data intensity M vs A plot

데이터의 확인을 더 용이하게 하기 위해 intensity ratio는 raw 값을 사용하지 않고 log-transformed intensity를 사용하여 scatter plot에서 spot의 intensity를 전체적으로 고르게 분산시켜 나타내었다(Fig. 9).

5) Normalized data intensity scatter plot

Scatter Plot은 데이터간의 관련성을 보여주는 것으로 Cy3 intensity와 Cy5 intensity의 상호 관련성을 시각적으로 표현한다. 두 개의 연속형 변수의 관계를 분석하는데 매우 효율적이다(Fig. 10).

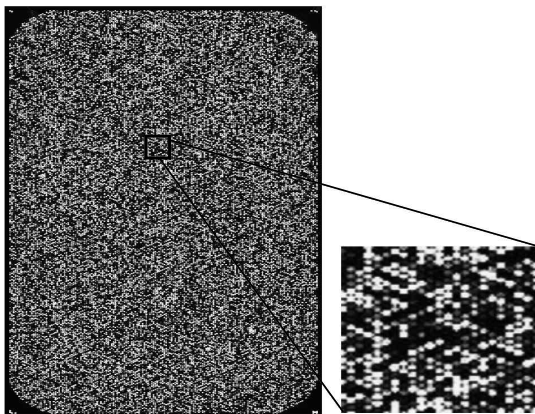


Fig. 8. Array images showing of gene expression of LCE.

6) Cluster diagram

Oligo DNA chip 상에 존재하는 유전자 중에서 LCE에 의한 영향으로 Cy5/Cy3 비율이 2.0배 이상의 변화를 보인 유전자는 6362개로, 유전자를 선별하여 Clustering 수행하였다(Fig. 11).

7) LCE에 의해 발현이 변화된 유전자 분석

Oligo DNA chip 유전자 중에서 2 fold 이상 over expression을 나타내는 유전자와 2 fold 이상 down expression을 나타내는 유전자를 확인 할 수 있었다. 2×up and down에서 unknown의 개수는 전체 6362

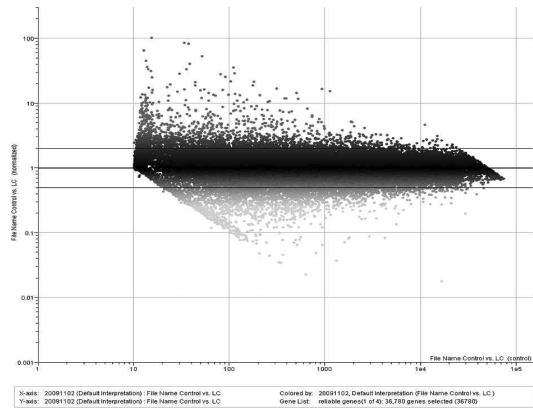


Fig. 9. M vs A plot(after normalization).
 $M = \log_2 R - \log_2 G$, $A = \log_2 R + \log_2 G$

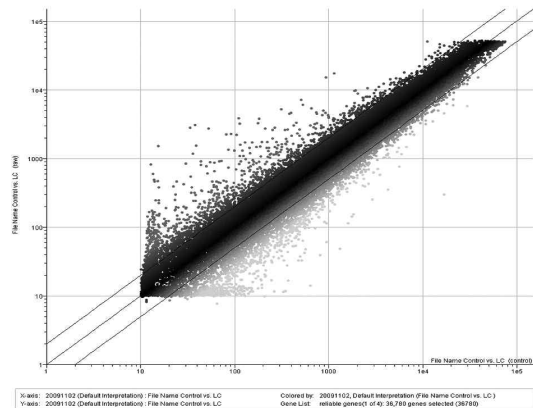


Fig. 10. Scatter plot.

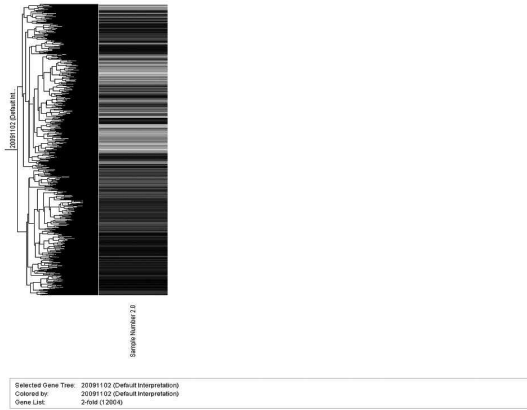


Fig. 11. Overview of RIN-m5F cells in cluster diagram.

개중 2755개로 43.3%를 차지하였으며, 대표적인 유전자를 아래 표에 제시하였다(Table 6,7).

6. KEGG pathway Maps 분석결과

2×up-regulated genes은 6,023 genes selected 중에서 Flags 값이 P로 표시된 pixel 값(1,100 genes selected)만 사용하였고, 2×down-regulated genes은 6,669 genes selected 중에서 Flags 값이 P로 표시된 pixel 값(2,400 genes selected)만 사용하였으며, 관련 유전자가 많은 pathway를 아래 표에 제시하였다 (Table 8,9).

Table 6. Partial List of Up Expressed Genes Changed in RIN-m5F Cells Affected by LCE

LCE	Genebank	Gene Symbol	Description
0.129962	BC087035	Tgfr1	transforming growth factor, beta receptor 1
0.148717	NM_031007	Adcy2	adenylate cyclase 2
0.165242	NM_030858	Smad7	MAD homolog 7(Drosophila)
0.187766	NM_022182	Fgf7	fibroblast growth factor 7
0.203648	NM_031795	Ugcg	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
0.208667	NM_173095	Kcna1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1
0.223301	NM_021679	Nxph3	neurexophilin 3
0.225567	NM_012565	Gck	glucokinase
0.231302	NM_031608	Gria1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA1(alpha 1)
0.237074	NM_053854	Nat2	N-Acetyltransferase-2(arylamine N-acetyltransferase)
0.239108	XM_215718	Pkn2	protein kinase N2
0.250986	NM_173116	Sgpl1	sphingosine phosphate lyase 1
0.280633	NM_017322	Mapk9	mitogen-activated protein kinase 9
0.284491	NM_133289	Scn9a	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha
0.287724	NM_053388	Gjb6	gap junction membrane channel protein beta 6
0.289292	NM_013174	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
0.29106	NM_021858	Gnb3	guanine nucleotide binding protein, beta 3
0.293564	NM_138872	Smad9	MAD homolog 9(Drosophila)
0.307288	NM_022184	Cask	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase(MAGUK family)
0.316827	NM_139217	Kcnc2	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2
0.353446	NM_012563	Gad2	glutamic acid decarboxylase 2
0.474993	AY325199	Igf2bp3	insulin-like growth factor 2, binding protein 3
0.480757	NM_012817	Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5
0.490894	XM_231739	Igf2bp3	insulin-like growth factor 2, binding protein 3
0.651481	NM_017071	Insr	insulin receptor

Table 7. Partial List of Down Expressed Genes Changed in RIN-m5F Cells Affected by LCE

LCE	Genebank	Gene Symbol	Description
3.062331	NM_053329	Igfals	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
3.062331	NM_053329	Igfals	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide(PTPRF), interacting protein(liprin), alpha 3
2.806441	XM_345790	Diras1_predicted	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2
2.74002	XM_341223	RGD1562860_predicted	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
2.614382	NM_133428	Hrg	similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4(MAP/microtubule affinity-regulating kinase like 1)(predicted)
2.601703	NM_134356	Ptprg	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2
2.567698	NM_023024	Dnch2	insulin-like growth factor binding protein 5
2.520583	XM_228973	RGD1564852_predicted	Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1
2.514561	NM_139258	Bmf	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4
2.39478	XM_225467	RGD1564062_predicted	calcium binding protein 4(predicted)
2.35536	XM_343778	Col4a5_predicted	monooxygenase, DBH-like 1
2.339992	XM_226598	RGD1561758_predicted	toll-like receptor 5
2.280956	NM_001025631	RGD1310837	guanylate cyclase activator 1B
2.253836	XM_235840	Slc36a4_predicted	proline dehydrogenase(oxidase) 2
2.197505	NM_139256	Man2c1	Interleukin 1 beta
2.194977	NM_198764	Sh3md2	NIMA(never in mitosis gene a)-related expressed kinase 7
2.189534	NM_173114	Cipar1	guanine nucleotide binding protein(G protein), beta polypeptide 2 like 1
2.185412	BC094306	Bcas1	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65
2.181991	NM_017147	Cfl1	interleukin 8 receptor, beta
2.163214	XM_231655	Adek2_predicted	Annexin A3
2.160427	XM_343986	Srp68_predicted	granzyme M(lymphocyte met-ase 1)
2.159535	AY580165	Acy1	TATA box binding protein(Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, C
2.132767	NM_017344	Gsk3a	Myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic
2.127886	NM_153627	Prop1	similar to GTPase activating protein testicular GAP1
2.077049	NM_024152	Arf6	prostaglandin E receptor 1
2.071805	NM_053402	Wnt4	putative scaffolding protein POSH
2.062073	NM_017208	Lbp	mitogen activated protein kinase kinase 7
2.059772	NM_198733	Cyp2b13	UDP-glucuronosyltransferase
2.019763	NM_207588	Oxgr1	ATP-binding cassette, sub-family G(WHITE), member 2
2.019679	NM_012757	Mas1	mitogen activated protein kinase kinase 4
2.017306	NM_001011913	Figl1	similar to apoptosis signal-regulating kinase 1
2.017213	XM_224613	Sema3g	serine(or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 8
2.008754	NM_017266	Ldhc	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha
1.96691	NM_130894	Mfn2	membrane frizzled-related protein(predicted)

Table 8. Pathway Relative to Up-regulated Genes

Relative pathway (rat) (amount of related genes)
mo01100 Metabolic pathways - Rattus norvegicus (rat) (37)
mo04144 Endocytosis - Rattus norvegicus (rat) (17)
mo05200 Pathways in cancer - Rattus norvegicus (rat) (16)
mo04010 MAPK signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (13)
mo04810 Regulation of actin cytoskeleton - Rattus norvegicus (rat) (12)
mo04740 Olfactory transduction - Rattus norvegicus (rat) (10)
mo04514 Cell adhesion molecules (CAMs) - Rattus norvegicus (rat) (10)
mo04060 Cytokine-cytokine receptor interaction - Rattus norvegicus (rat) (10)
mo04510 Focal adhesion - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04620 Toll-like receptor signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (8)
mo04722 Neurotrophin signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (8)
mo04360 Axon guidance - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04666 Fc gamma R-mediated phagocytosis - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo05212 Pancreatic cancer - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04612 Antigen processing and presentation - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo05320 Autoimmune thyroid disease - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04062 Chemokine signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04530 Tight junction - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo05332 Graft-versus-host disease - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo05416 Viral myocarditis - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo04020 Calcium signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo04310 Wnt signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo04920 Adipocytokine signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo04940 Type I diabetes mellitus - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo05016 Huntington's disease - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo05330 Allograft rejection - Rattus norvegicus (rat) (6)
mo04912 GnRH signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (5)
mo04630 Jak-STAT signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (5)
mo05219 Bladder cancer - Rattus norvegicus (rat) (5)
mo04142 Lysosome - Rattus norvegicus (rat) (5)
mo04110 Cell cycle - Rattus norvegicus (rat) (5)

KEGG pathway maps 중 metabolic pathways에 관련된 유전자가 77개로 가장 많은 수를 차지하였으며, 발현된 유전자 중 insulin signaling pathway 및 type I diabetes mellitus, type II diabetes mellitus

Table 9. Pathway Relative to Down-regulated Genes

Relative pathway (rat) (amount of related genes)
mo01100 Metabolic pathways - Rattus norvegicus (rat) (40)
mo04010 MAPK signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (17)
mo05200 Pathways in cancer - Rattus norvegicus (rat) (16)
mo04510 Focal adhesion - Rattus norvegicus (rat) (16)
mo04080 Neuroactive ligand-receptor interaction - Rattus norvegicus (rat) (14)
mo04810 Regulation of actin cytoskeleton - Rattus norvegicus (rat) (13)
mo04020 Calcium signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (12)
mo04310 Wnt signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (12)
mo04912 GnRH signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (11)
mo04062 Chemokine signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (11)
mo04530 Tight junction - Rattus norvegicus (rat) (11)
mo04630 Jak-STAT signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (10)
mo04110 Cell cycle - Rattus norvegicus (rat) (10)
mo04144 Endocytosis - Rattus norvegicus (rat) (10)
mo04622 RIG-I-like receptor signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04740 Olfactory transduction - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04620 Toll-like receptor signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04670 Leukocyte transendothelial migration - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04270 Vascular smooth muscle contraction - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04540 Gap junction - Rattus norvegicus (rat) (9)
mo04350 TGF-beta signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (8)
mo04070 Phosphatidylinositol signaling system - Rattus norvegicus (rat) (8)
mo05210 Colorectal cancer - Rattus norvegicus (rat) (8)
mo04360 Axon guidance - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04720 Long-term potentiation - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo05010 Alzheimer's disease - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04120 Ubiquitin mediated proteolysis - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04130 SNARE interactions in vesicular transport - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04910 Insulin signaling pathway - Rattus norvegicus (rat) (7)
mo04060 Cytokine-cytokine receptor interaction - Rattus norvegicus (rat) (7)

와 관련성도 검색되었다. 여기서는 insulin signaling pathway를 소개 하도록 한다(Fig. 12).

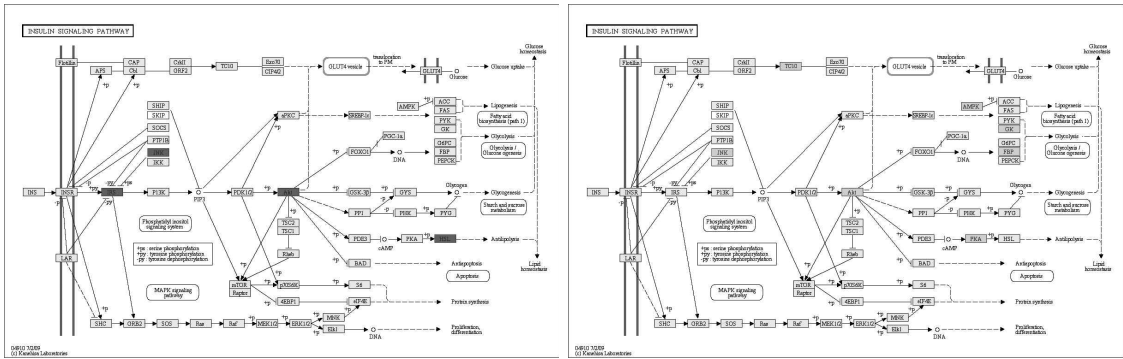


Fig. 12. Insulin signaling pathway - Rattus norvegicus(rat).

Red: 2×up-regulated genes(Irs1, Mapk8, Akt1, Lipe), Green: 2×down-regulated genes(Rhoq, Fbp2, Prkar2b, Gck, Prkag1)

7. LCE가 인슐린 관련 유전자 발현에 미치는 영향

1) INS-1

INS-1 mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 0.80±0.19, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 0.44±0.04로 나타났다(Fig. 13).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6µg/ml를 투여한 군은 0.56±0.11, LCE 12µg/ml를 투여한 군은 0.62±0.25로 대조군에 비하여 INS-1 mRNA 발현이 증가

하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 13).

2) INS-2

INS-2 mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 10.08±1.47, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 5.24±2.40로 나타났다(Fig. 14).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6µg/ml를 투여한 군은 5.91±0.02, LCE 12µg/ml를 투여한 군은 6.58±1.06으로 대조군에 비하여 INS-2 mRNA 발현이 증

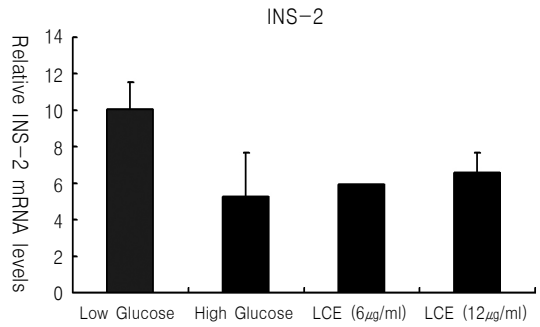
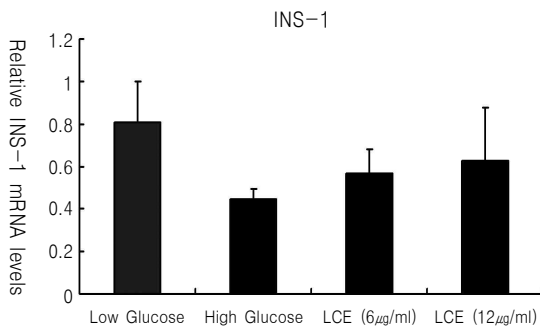


Fig. 13. Effect of LCE on INS-1 mRNA in RIN-m5F cells.

Fig. 14. Effect of LCE on INS-2 mRNA in RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12µg/ml) for 48hr. The expression levels of INS-1 mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D.

RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12µg/ml) for 48hr. The expression levels of INS-2 mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D.

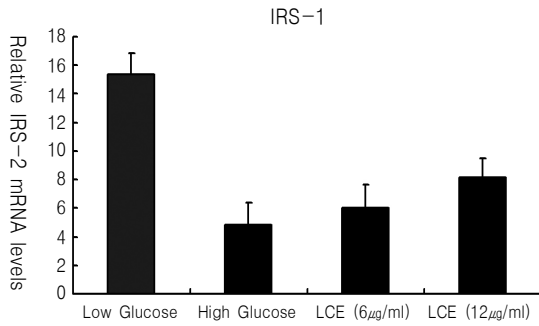


Fig. 15. Effect of LCE on IRS-1 mRNA in RIN-m5F cells. RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of IRS-1 mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D.

가하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 14).

3) IRS-1

IRS-1 mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 15.34±1.50, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서

4.88±1.52로 나타났다(Fig. 15).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한 군은 5.99±1.65, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 8.15±1.32로 대조군에 비하여 IRS-1 mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 15).

4) IRS-2

IRS-2 mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 51.41±9.76, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 9.56±1.77로 나타났다(Fig. 16).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한 군은 16.78±5.10, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 21.05±3.81로, LCE 12μg/ml 투여군에서 IRS-2 mRNA 발현이 대조군에 비하여 유의성(P<0.05) 있게 증가하였다(Fig. 16).

5) IRS-3

IRS-3 mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 31.10±7.84, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 14.93±4.26으로 나타났다(Fig. 17).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한

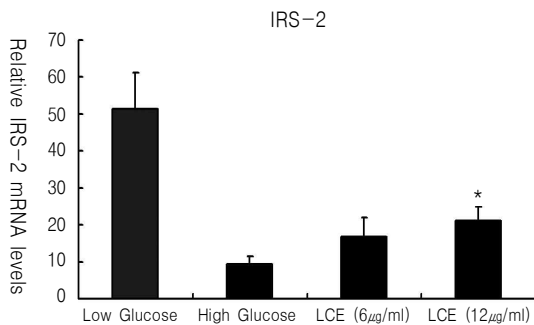


Fig. 16. Effect of LCE on IRS-2 mRNA in RIN-m5F cells. RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of IRS-2 mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D. *: p<0.05 vs cell with vehicle in high glucose.

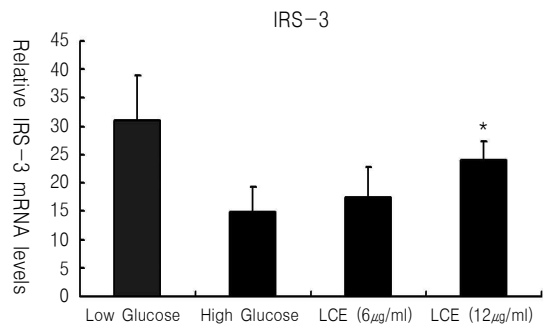


Fig. 17. Effect of LCE on IRS-3 mRNA in RIN-m5F cells. RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of IRS-3 mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D. *: p<0.05 vs cell with vehicle in High glucose.

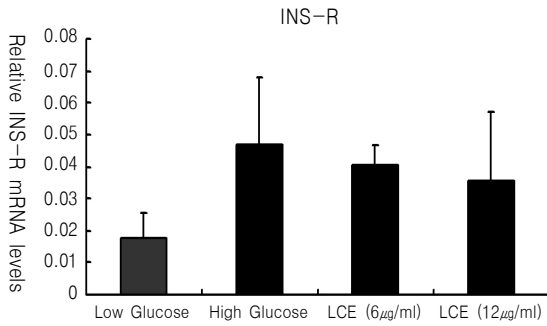


Fig. 18. Effect of LCE on INS-R mRNA in RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of INS-R mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D.

군은 17.40±5.45, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 24.15 ±3.18로, LCE 12μg/ml 투여군에서 IRS-3 mRNA 발현이 대조군에 비하여 유의성(P<0.05) 있게 증가하였다(Fig. 17).

6) INS-R

INS-R mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 0.017±0.007, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 0.046±0.021로 나타났다(Fig. 18).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한 군은 0.040±0.006, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 0.035±0.021로 대조군에 비하여 INS-R mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 18).

7) GCK

GCK mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 0.023±0.003, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 0.027±0.002로 나타났다(Fig. 19).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한 군은 0.02±0.001, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 0.021±0.001로, 두 실험군 모두에서 GCK mRNA 발현이 대조군에 비하여 유의성(P<0.05) 있게 감소하였다(Fig. 19).

8) GLP-1R

GLP-1R mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 0.0046±0.001, 고농도 포도당 투여군

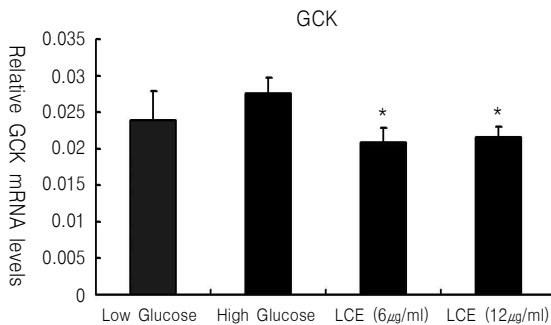


Fig. 19. Effect of LCE on GCK mRNA in RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of GCK mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D. *: p<0.05 vs cell with vehicle in high glucose.

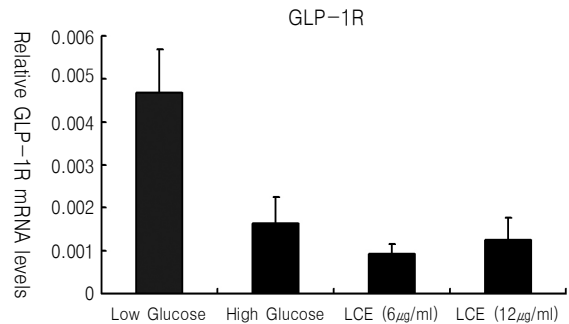


Fig. 20. Effect of LCE on GLP-1R mRNA in RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of GLP-1R mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D.

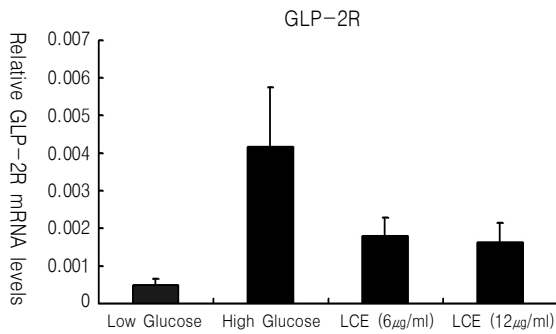


Fig. 21. Effect of LCE on GLP-2R mRNA in RIN-m5F cells. RIN-m5F cells were treated with low glucose(5mM), high glucose(20mM) and high glucose(20mM) with LCE(6, 12μg/ml) for 48hr. The expression levels of GLP-2R mRNA and beta-actin were analyzed by real time RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Real-time RT-PCR experiments were carried out in triplicates. Values are means±S.D.

(20mM)에서 0.0016±0.0005로 나타났다(Fig. 20).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한 군은 0.0009±0.0002, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 0.0012±0.0005로 대조군에 비하여 GLP-1R mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 20).

9) GLP-2R

GLP-2R mRNA 발현은 저농도 포도당 투여군(5mM)에서 0.0047±0.0017, 고농도 포도당 투여군(20mM)에서 0.0415±0.0157로 나타났다(Fig. 21).

고농도 포도당(20mM)에 LCE 6μg/ml를 투여한 군은 0.0179±0.0049, LCE 12μg/ml를 투여한 군은 0.0162±0.0051로 대조군에 비하여 GLP-2R mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 21).

고찰

당뇨병은 크게 췌장 베타 세포 파괴에 의한 인슐린결핍으로 발생한 제 1형 당뇨병과 인슐린 분비 및 작용의 결함에 의하여 발생한 제 2형 당뇨병으로 구분된다¹⁹⁾. 최근에는 제 1형 당뇨병 뿐 아니라 제 2

형 당뇨병에서도 베타 세포의 역할이 강조되고 있으며, 제 2형 당뇨병에서의 췌장의 베타 세포 기능은 진단 시 이미 정상치의 50% 이하로 감소되어 있고, 시간이 지날수록 점차 악화된다고 알려져 있다²⁰⁻²²⁾.

여러 가지 자극들이 베타 세포의 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 대표적으로 고혈당에 의한 포도당 독성, 지방산에 의한 지질 독성, ROS의 증가에 의한 산화스트레스 등이 있다³⁾. 이 중 포도당 독성은 췌장 소도 베타 세포가 장기간 고혈당에 노출되어 인슐린 mRNA 및 인슐린유전자 전사인자, 인슐린 분비능 등이 감소하는 것을 의미하며^{2,3)}, 포도당 대사 과정에서 ROS의 생성이 증가되고, 이로 인한 산화스트레스가 세포 기능을 저하시켜 나타나는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

당뇨병에서 ROS의 생성은 oxidized LDL, autoxidation, polyol pathway, advanced glycation end-products(AGEs), free fatty acid, leptin 등의 다양한 경로를 통하여 이루어지고, 이렇게 생성된 ROS는 산화 스트레스에 취약한 췌장 소도세포에 독성으로 작용하게 된다²³⁾.

이에 ROS의 생성과 관련된 기전을 파악하여 산화스트레스를 줄이기 위한 연구²³⁾와 항산화제 투여에 따른 세포 보호 효과에 대한 연구^{6-9,18)}가 지속적으로 진행되고 있으며, 또한 항산화 효과가 높은 본초^{10,11)} 및 처방¹²⁻¹⁴⁾의 혈당강하 효과와 세포 보호 효과²⁴⁾에 대한 연구가 보고되고 있다.

夜關門(Lespedeza cuneata G. Don)은 콩과 반관목의 전초 또는 뿌리까지 달린 전초로, 肺, 肝, 腎 三經에 歸經하며, 性은 涼하고, 味는 苦辛하다¹⁵⁾. 肝腎을 保養하고, 肺陰을 도우며, 어혈을 제거하고, 부종을 억제하는 효능이 있어, 임상에서 遺精, 遺尿, 白濁, 白帶, 喘息, 胃痛, 勞傷, 小兒疳積, 泄瀉, 打撲傷, 視力減退, 赤目, 급성 유선염의 치료에 활용하며, 민간에서는 당뇨병에 이용되고 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 최근에는 산화 스트레스로 H₂O₂를 이용한 이등¹⁸⁾의 보고에서 야관문 메탄올 추출물 50μg/ml이 RIN-m5F 세포의 생존율을 29.3%에서 55.9%로 증가시킨 결과를 보여 주었으며, 열수 추출물과 에탄

을 추출물의 항산화 효과¹⁶⁾와 동물 실험을 통한 혈당 강하 효과¹⁷⁾가 보고되었다.

하지만 야관문 열수 추출물(LCE)의 베타 세포 보호 효과와 인슐린 분비에 미치는 영향 및 분자생물학적 기전에 대한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 LCE의 포도당 독성에 대한 베타 세포 보호 효과와 인슐린 분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RIN-m5F 세포에 포도당 자극을 가한 후 LCE 투여에 따른 세포 생존율의 변화와 인슐린 분비를 관찰하였고, 분자생물학적 screening을 위하여 유전자 발현에 미치는 영향을 DNA chip을 활용하여 분석하였다. 또한 DNA chip에서 발현의 변화가 있었던 유전자를 KEGG pathway 검색을 통하여 대사과정 정보를 확인하였으며, 마지막으로 인슐린 관련 유전자의 발현을 real time RT-PCR로 분석하여 LCE의 효과를 확인하였다.

본 실험에 사용한 RIN-m5F 세포는 rat의 췌장 베타 세포에서 유래한 인슐린종 세포로서 각종 in vitro 당뇨병 및 췌장 베타 세포 기능이상 연구에 적용되고 있다²⁵⁾. DNA chip은 Agilent Whole Rat Genome Microarray 44K oligo DNA chip를 활용하였으며, DNA chip은 하나의 chip에 여러 종류의 DNA가 부착되어 있어 많은 수의 유전자를 동시에 분석할 수 있고, 극히 소량의 샘플만으로 분석할 수 있는 장점을 가진다²⁶⁾.

우선 LCE의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거 작용과 SOD 항산화 활성을 측정하였다. DPPH는 산화/환원 환경에 따라 색을 띠는 라디칼로 시료의 라디칼 제거능력을 측정할 수 있으며, 양성 대조군으로 사용한 EAE는 빛, 열, pH 등에 의해 쉽게 변성되지 않도록 비타민C를 안정화시킨 물질로 대표적인 항산화 물질이다²⁷⁾. SOD는 산화적 스트레스에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 효소로서 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는데 관여한다²⁸⁾. 실험 결과 LCE의 DPPH 라디칼 소거 작용은 상대적으로 EAE에 미치지 못하는 못하였으나, 농도에 따라 증가하는 것으로 나타났다, SOD 활성 역시 농도에 따라 증가한 것으로

나타났다. 이러한 결과로 야관문의 항산화 효과¹⁶⁾를 다시한번 확인하였고, ROS의 소거와 이에 따른 포도당 독성의 보호에도 유의한 작용을 할 가능성을 유추할 수 있었다.

LCE의 베타 세포 생존율에 미치는 영향을 알기 위하여 진행된 실험에서는 저농도 포도당 처리군(5mM)의 LCE 12 μ g/ml에서 유의하게 세포 생존율이 억제되는 소견이 관찰되었으며, LCE(-)군과 LCE(+)군의 비교 실험에서는 저농도 포도당 처리군(5mM)에서 유의한 감소가 관찰되었다. LCE(-)군의 저농도 포도당 투여군(5mM)에 비하여, 고농도 포도당 투여군(20mM)의 RIN-m5F 세포 생존율이 감소한 것은 고농도 포도당이 RIN-m5F 세포에 포도당 독성으로 작용했음을 확인시켜주는 결과이며, 고농도 포도당 투여군에서 LCE(-)군과 LCE(+)군의 큰 차이가 없었던 것은 야관문 열수 추출물이 RIN-m5F 세포에서 포도당 독성에 대한 세포보호 효과에 유의한 영향을 미치지 않음을 보여주는 결과라고 판단된다. 이는 이 등¹⁸⁾의 결과와는 대조적인 것으로 추출물의 차이와 투여 용량의 차이, 산화스트레스 유발 물질의 차이에 의해 나타난 것으로 생각된다. 또한 저농도 포도당 투여군에서 세포 생존율이 감소한 소견은 LCE가 포도당 독성을 나타내지 않은 상태의 RIN-m5F 세포에서는 세포 보호 효과가 아닌 다른 기전으로 작용할 수 있을 가능성도 보여준다고 할 수 있다.

만성적으로 고농도 포도당에 노출되었을 때 인슐린 분비능에 미치는 LCE의 효과를 알아보기 위해, 포도당 자극 인슐린분비(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)를 측정 한 실험에서는, 포도당 독성이 있는 고농도 포도당 투여군에서 LCE 농도에 따라 인슐린 분비량이 증가하였으며, LCE 6 μ g/ml, 8 μ g/ml, 10 μ g/ml, 12 μ g/ml의 농도에서 유의성이 관찰되어, LCE가 고농도 포도당 상태에서 RIN-m5F 세포의 인슐린 분비를 촉진하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 세포 생존율에 대한 실험과 비교하여 볼 때 LCE는 세포 보호 효과가 아닌 다른 기전을 통하여 인슐린 분비를 촉진하는 것으로 생각할 수

있으며, 그 기전은 차후에 좀 더 구체적으로 연구되어야 할 것으로 판단된다.

LCE 투여가 RIN-m5F 세포에서의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행된 DNA chip 검사에서는, oligo DNA chip 상에 존재하는 유전자 중 LCE 투여에 대조군에 비하여 Cy5/Cy3 비율이 2.0배 이상의 변화를 보인 유전자는 6362개로 확인되었으며, 이 중 unknown의 갯수는 2755개로 43.3%를 차지하였다.

Tgfb1, Adcy2, Smad7, Fgf7, Ugcg, Kcna1, Nxp3, Gck, Gria1, Nat2, Pkn2, Sgpl1, Mapk9, Scn9a, Gjb6, Tgfb3, Gnb3, Smad9, Cask, Kcnc2, Gad2, Igf2bp3, Igfbp5, Igf2bp3, Insr 등의 유전자가 대조군에 비하여 2배 이상 발현이 상승된 것으로, Igfals, Igfals, Diras1_predicted, RGD1562860_predicted, Hrg, Ptprg, Dnch2, RGD1564852_predicted, Bmf, RGD1564062_predicted, Col4a5_predicted, RGD1561758_predicted, RGD1310837, Slc36a4_predicted, Man2c1, Sh3md2, Cipar1, Bcas1, Cfl1, Adck2_predicted, Srp68_predicted, Acy1, Gsk3a, Prop1, Arf6, Wnt4, Lbp, Cyp2b13, Oxgr1, Mas1, Figl1, Sema3g, Ldhc, Mfn2 등의 유전자가 대조군에 비하여 2배 이상 발현이 저하된 것으로 나타났다.

이렇게 DNA chip으로 분석된 발현이 증가되거나 감소된 유전자 간의 상호 작용하는 대사과정의 정보를 알기 위하여 KEGG검색을 실시하였다. KEGG는 1995년 5월 the Japanese human genome programme 하에 시작되어, 분자 및 세포 생물학 지식과 분자간 및 유전자간의 대사과정을 컴퓨터로 처리한 것으로, 본 논문에 사용된 pathway maps-represented by graphical diagrams는 분자 또는 유전자 간의 상호 작용하는 대사과정 정보를 나타내기 위해 그래픽 diagram을 사용한다.

KEGG의 pathway 중 LCE는 metabolic pathways에서 가장 많은 관련을 보였으며, 이 metabolic pathways외에 insulin signaling pathway, type I diabetes mellitus, type II diabetes mellitus 등을 포함한 다양한 pathway와의 관련성을 찾을 수 있었다.

Insulin signaling pathway 내에서는 Irs1, Mapk8, Akt1, Lipe 등의 유전자가 발현이 증가하였고, Rhoq, Fbp2, Prkar2b, Gck, Prkag1 등의 유전자가 발현이 감소하여, LCE가 INS-R에서 IRS를 지나 JNK로 이어지는 신호전달과 PDK1/2에서 AKT, PD3, PKA, HSL로 이어지는 신호전달에 주로 관여하는 것을 확인할 수 있었다. 발현된 유전자가 많고, 그에 따라 다양한 대사 과정에 영향을 미쳐 LCE의 영향을 구체화 시키고, 단순화 시키기는 어려웠으나, 인슐린 대사 및 당뇨병과는 일정부분 관련이 있는 것으로 생각할 수 있다.

마지막으로 real time RT-PCR을 이용하여 측정된 인슐린 관련 유전자와의 관련성은 INS-1, INS-2, IRS-1, IRS-2, IRS-3의 경우 LCE의 투여에 따라 그 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, 특히 IRS-2, IRS-3의 발현은 LCE 12 μ g/ml에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. GCK의 발현은 6 μ g/ml, 12 μ g/ml 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, INS-R과 GLP-1R, GLP-2R의 발현은 6 μ g/ml, 12 μ g/ml 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 감소하였다.

INS-1, INS-2는 insulin signaling pathway에서 막을 통과할 수 있는 수용체인 INS-R을 활성화시키는 유전자이고, IRS는 INS-R의 활성을 하부역할자로 전달하는데 있어 주도적인 역할을 하게 되는 유전자이다^{29,30}. 특히 IRS-1과 IRS-2는 인슐린의 당대사와 관련되어 신호전달체계의 가장 중요한 조절자인 PI3 Kinase를 통하는 예로 잘 알려져 있다^{29,30}. GCK는 간과 췌장 베타 세포에서 혈중 내 포도당을 인지하여 인슐린 분비를 조절하는 포도당 감지 기구로서의 역할을 가진 유전자로, 간에서는 인슐린 증가에 의해 활성이 증가되고, 췌장에서는 인슐린 증가에 의해 활성이 낮아져, 혈당 수준에 맞는 인슐린 분비를 매개하는 대사 신호가 된다³¹. GLP-1R과 GLP-2R은 GLP-1과 GLP-2를 발현시키는 유전자로, GLP-1은 주로 췌장의 베타 세포에서 인슐린 생성³²과 분비의 조절인자로 작용하고^{32,33}, 글루카곤 분비를 억제하여 인슐린 작용을 증강시키는 역할을 한다³⁴.

GLP-2는 GLP-1과 유사하게 소장의 L-cell에서 생성되며, 주로 소장의 성장과 영양 섭취에 관련된 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

본 실험에서 INS와 IRS가 농도 의존적으로 증가하고 GCK가 감소한 것은 LCE가 기타 기전으로 인슐린 분비를 증가시켜 나타났거나 유전자 신호 전달 체계에 직접적으로 작용하여 나타난 것으로 생각되며, INS-R이 대조군에서 증가한 것은 인슐린 감소에 대한 2차적 변화에 따라 수용체가 증가한 것으로, LCE 투여군에서 감소한 것은 LCE 투여로 인슐린의 분비가 증가했기 때문으로 생각된다. 또한 인슐린 분비의 조절 인자로 알려진 GLP-1R이 LCE 투여군에서 감소한 것은 인슐린 분비 증가에 따라 나타난 변화로 생각되나, 과정에 따른 인과관계에 대하여는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편 GLP-2R이 감소한 것은 LCE가 소장에서의 탄수화물의 흡수 과정을 억제하는 효과가 있어 체내 혈당강하에 유의하게 작용할 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

이상의 결과로 LCE가 다양한 유전자의 복합적 작용에 의하여 인슐린 분비와 대사를 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다. 이에 당뇨병의 예방과 치료에도 유의하게 활용 할 수 있을 것으로 기대되며, 향후 좀 더 구체화된 유전자 분석에 따른 기전 연구와 임상적 연구 및 기타 추출물의 효능에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

RIN-m5F 세포에서 야관문 열수 추출물의 항산화 효과와 포도당 독성에 대한 세포 보호 효과, 인슐린 분비에 미치는 영향 및 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 야관문 열수 추출물은 free radical 소거능과 SOD 활성을 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다
2. 야관문 열수 추출물은 저농도 포도당 자극 (5mM)에서 RIN-m5F 세포의 생존율을 대조군

에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.

3. 야관문 열수 추출물은 6 μ g/ml, 8 μ g/ml, 10 μ g/ml, 12 μ g/ml의 농도에서 인슐린 분비를 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다.
4. 야관문 열수 추출물은 oligo DNA chip 유전자 중 6362개 유전자의 발현을 대조군에 비하여 2배 이상 증가시키거나 감소시켰다.
5. 야관문 열수 추출물에 의해 발현이 증가되거나 감소된 유전자 중 KEGG pathway maps의 metabolic pathways에 관련된 유전자가 77개로 가장 많은 수를 차지하였다.
6. 야관문 열수 추출물은 KEGG pathway maps의 Insulin signaling pathway에서 Irs1, Mapk8, Akt1, Lipe 등의 유전자 발현을 대조군에 비하여 2배 이상 증가시켰고, Rhoq, Fbp2, Prkar2b, Gck, Prkag1 등의 유전자가 발현을 대조군에 비하여 2배 이상 감소시켰다.
7. 야관문 열수 추출물은 IRS-2, IRS-3의 발현을 12 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다.
8. 야관문 열수 추출물은 GCK의 발현을 6 μ g/ml, 12 μ g/ml 두 농도에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.

참고문헌

1. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 2004;279(41):279:42351-4.
2. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes.* 2003;52(3):581-7.
3. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poytout V. β -Cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(S1):S119-24.

4. Yoon JS, Won KC, Lee HW. Glucose Oxidation and Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in INS-1 Cells and Rat Islet Cells Exposed to High Glucose. *Diabetes*. 2006;30:246-53.
5. Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *J Bio chem*. 1987;245(1):243-50.
6. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997;46(11):1733-42.
7. Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *PNAS*. 1999;96:10857-62.
8. Kwon MJ, Jung HS, Kim MK, Kang SH, Seo GW, Song JK et al. Diabetes. Cytoprotective Effect by Antioxidant Activity of Quercetin in INS-1 Cell Line. 2007;31(5):383-90.
9. Ryu GR, Min DS, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Jo YH et al. The Inhibitory Effect of Epicatechin on IL-1 β -induced iNOS Expression and NO Production in RINm5F Cell. *Diabetes*. 2003; 27(6):456-66.
10. Lee CW, Shin HC, Jeong JC. Effects of the Extract in Streptozotocin- induced Diabetic Rats. *Korean Oriental Medical Society*. 2006;27(1): 91-103.
11. Kim OG, Jeong JC. Effects of the Mori folium Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of korean oriental internal medicine*. 2006;27(4):811-21.
12. Choi JS, Chang SK, Cho CS, Kim CJ, Han DU. Effects of Sopyung-tang Extract on Blood Glucose & Antioxidant Enzyme Activities of Streptozotocin- induced Diabetic Rats. *Journal of korean oriental internal medicine*. 2008;29(1): 90-103.
13. Gong TH, Jeong JC. Effects of Ojung-hwan on Blood Glucose, Hyperlipidemia, Polyol Pathway and Antioxidative Mechanism in Ob/ob Mouse. *Journal of Korean oriental medical society*. 2007;28(3):57-69.
14. Park SD, Ju WS, Go WD. Effects of Hyulbuchu-keotang and its component groups on diabetes, free radical and antioxidative defense system in alloxan-induced diabetic rats. *The Korea Association of Herbology*. 2002; 17(1):93-111.
15. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순, 강병수, 강상수 외. *중약대사전*. 서울:도서출판정담. 1997:2770-3.
16. Kim SJ, Kim DW. Antioxidative Activity of Hot Water and Ethanol Extracts of *Lespedeza cuneata* Seeds. *Journal of the Korean Society of Post-Harvest Science & Technology of Agricultural Products*. 2007;14(3):332-5.
17. Kim MS, Min OJ, Rhyu DY. Effect of *Lespedeza cuneata* Extracts on Diabetes and Diabetic Nephropathy. *The plant resources of society of Korea*. 2008;4:83.
18. Lee DS, Jeong GS, An RB, Bin Li, Erisa Byun, Kim YC. Search for Plant Extracts with Protective Effects of Pancreatic Beta Cell against Oxidative Stress. *Kor. J. Pharmacogn*. 2008;39(4):335-40.
19. 대한당뇨병학회. *당뇨병의 진단 및 분류 권고안* : 당뇨병의 분류. *임상당뇨병*. 2007;8(1):31-3.
20. Donath MY, Ehlers JA, Maedler K, Shumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E et al. Mechanisms of beta cell death in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(S2):S108-13.
21. Holman RR. Assessing the potential for α -glucosidase inhibitors in prediabetic states. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998;40(S1):S21-5.
22. UK Prospective Diabetes study group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes(UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837-53.
23. Kim SS, Son SM. Oxidative Stress and Cell

- Dysfunction in Diabetes: Role of ROS Produced by Mitochondria and NAD(P)H Oxidase. *Diabetes*. 2008;32:389-98.
24. An SH, Cho CS, Kim CJ. Effects of Radix Sophora Flavescentis Extract on Insulin Secretion in RIN-m5F Cells and α -glucosidase Inhibition. *Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. 2009;30(3):481-94.
25. Sartori A, Garay-Malpartida HM, Forni MF, Schumacher RI, Dutra F, Sogayar MC et al. Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RIN-m5F cells. *Chem Res Toxicol*. 2008;21:1841-50.
26. Jung ED, Lee JH, Jang WG, Kim JG, Kim BW, Lee IK. Microarray Analysis of Short Heterodimer Partner (SHP)- induced Changes in Gene Expression in INS-1 Cells. *Diabetes*. 2007;31(3):193-9.
27. Kim JW, Joe YG, Suh KD. Poly(methyl methacrylate) hollow particles by water-in-oil-in-water emulsion polymerization. *Colloid Polym Sci*. 1999;277:252-6.
28. Sakamoto Y, Higashi T. *Glutathione*. Japan: Scientific societies; 1989, p.5.
29. Chung JK. Hormone Signalings Mediated by Receptor Tyrosine Kinases -Insulin model-. *Korean J Endocrinology*. 2000;15(3): 342-52.
30. Son HS. Review of Insulin Signaling Network . *Diabetes*. 2005;29(5):383-92.
31. Nam JH, Lee HC, Kim YE, Kwon SH, Yoon YS, Park SW et al. Glucokinase gene mutation in non-insulin- dependent diabetes mellitus(NIDDM), and secondary diabetes in Koreans. *Korean J Intern Med*. 1998;54(6):755-64.
32. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999;48:2270-6.
33. Kreymann B, Ghatei MA, Williams G, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1(7-36): a physiological incretin in man. *Lancet*. 1987;2:1300-4.
34. Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N et al. Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide. *Diabetes*. 1989;38:902-5.
35. Laurie D, Alan BT. Intestinal hormones and growth factors: Effects on the small intestine. *World J Gastroenterol*. 2009;15(4):385-406.