

## 면역억제능을 보유한 地榆의 인슐린 분비능 연구

황석연<sup>1</sup> · 김명현 · 강정수 · 김병수\*

대전대학교 한의과대학 생리학교실, 1 : 대전대학교 자연과학대학 임상병리학과

Study of Immunosuppressive Activity and Insulin Secretion by Treated *Sanguisorba Officinalis*Seock Yeon Hwang<sup>1</sup>, Myung Hyun Kim, Jung Soo Kang, Byoung Soo Kim\*

Department of Physiology, College of Korean Medicine,

1 : Department of Biomedical Laboratory Science, College of Natural Science, Daejeon University

Immunosuppressors cyclosporine A(CsA) and tacrolimus(FK506), the primary cellular target of which is calcineurin/nuclear factor of activated T cells(NFAT) signalling pathways, decrease beta-cell insulin content and mRNA expression. The posttransplantation diabetes mellitus(PTDM) is a frequent complication in immunosuppressive therapy. The present study was to examine the effect of a crude water extracts of medicinal herbs such as *Sanguisorba officinalis*(SOE) on the immunosuppressive activity with lymphocyte and insulin secretion in insulinoma cell lines with RIN-5mF. It was found that SOE treatment had effect of immunosuppressor on lymphocytes and also significantly increased insulin secretion in RIN-5mF compared to other agents. we might suggest a mechanism on insulin secretion by HNF4a. Taken together, the present study suggested that SOE might serve as immunosuppressive drug in PTDM.

keywords : *Sanguisorba officinalis*, immunosuppressor, insulin secretion, HNF-4 $\alpha$

## 서론

대표적인 면역억제제인 Cyclosporine(CsA)과 Tacrolimus(FK506)는 T 세포 활성화의 초기단계에 작용하여 면역억제작용을 나타낸다. 이 두 약은 세포질 내의 임뮤노필린(immunophilin)과 결합하여 복합체를 형성한다. 이들 복합체는 탈인산효소(serine/threonine phosphatase)인 칼시뉴린(calcineurin)과 결합하여, 탈인산효소(phosphatase) 활성을 저해시킨다. 즉, 세포질 내의 NFAT(nuclear factor of activated T cells)가 핵 내로 이동하는 것을 막아 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2)의 전사인자로서의 역할을 억제함으로써 IL-2 생성을 억제시킨다. 이러한 효과는 도움(helper) T 세포에 비교적 특이하게 작용하며, 여러 다른 사이토카인 생성도 억제시킨다<sup>1,2)</sup>. 이처럼 CsA와 FK506은 칼시뉴린의 활성화를 억제하는 면역 억제 기전으로 지금까지의 면역억제제 중 가장 널리 사용되고 있다<sup>3)</sup>.

이와 같은 면역억제제는 장기 이식 후에 평생 동안 복용해야 하며, 이로 인하여 발생한 당뇨병, 고혈압, 고지혈증에 의한 혈관 관련 합병증과 골다공증은 이식환자의 생존율을 감소시키

며 아울러 삶의 질을 현저히 떨어뜨린다. 이중에서 이식후 당뇨병(posttransplantation diabetes mellitus, PTDM)은 고혈당으로 인해 미세혈관 합병증뿐만 아니라 죽상경화증에 의한 혈관 관련 합병증도 가속화시켜 이식환자의 사망률과 이환율을 현저히 증가시킨다<sup>4)</sup>. 따라서 이들을 개선하기 위한 면역억제능이 있으면서 체장의 베타세포를 손상시키지 않는 약물이 요구되는 상황이다.

지유는 장미과(薔薇科, Rosaceae)에 속한 다년생 본초인 오이풀(*Sanguisorba officinalis* Linne.) 또는 기타 동속 근연식물의 뿌리<sup>5)</sup>를 말하며, 신맛과 쓴맛, 뚝은맛을 내며 무향, 무독이다<sup>6)</sup>. 한방에서는 혈분의 열을 식혀 피를 멎게 하고(涼血止血) 독을 풀어주어 종기를 아물게 한다(解毒斂瘡) 하여 변혈(便血), 치혈(痔血), 혈리(血痢), 붕루(崩漏) 및 끓는 물이나 불에 덴 상처(水火燙傷), 종기와 부스럼의 독(癰腫瘡毒)에 쓰인다<sup>7)</sup>.

지유의 약리성분으로는 뿌리에 함유되어 있는 지그글루코시드(ziguglycoside) I, II와 포몰릭 산(pomolic acid)등이 있고 가지에 함유되어 있는 케르세틴(quercetin)과 캠페롤(kaempferol)의 배당체와 우르솔릭 산(ursolic acid) 등 트리테르페노이드(triterpenoid)계 사포닌(saponin)이 있으며 잎에 함

\* Corresponding author

Byoung Soo Kim, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, 300-716, Korea

·E-mail : kbssoo25@dju.kr ·Tel : +82-42-280-2616

·Received : 2014/08/19 ·Revised : 2014/09/18 ·Accepted : 2014/09/18

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529

Available online at www.hantopic.com

유되어 있는 비타민(vitamin) C, 꽃에는 크리산테민(chrysanthemin), 시아닌(cyanin)이 있다<sup>8)</sup>.

지유에 대한 연구로는 지유의 성분<sup>9,10)</sup> 및 항균 작용<sup>11)</sup>과 항암작용<sup>12)</sup>에 관한 보고가 있으나, 면역억제능과 인슐린 분비능에 관한 보고는 아직 없는 상태이다. 본 연구는 지유의 면역억제능을 확인한 다음 인슐린 분비능도 있다는 사실을 in vitro 실험을 통해 확인한 연구 결과를 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 한약재의 추출

본 연구에서 사용한 한약재 지유 추출물(Sanguisorba officinalis Linne. Extract, SOE)은 증류수 2,000 mL에 지유 100g을 넣어 100°C에서 2시간 동안 열수 추출한 후 3,000rpm에서 30 분간 원심 분리하여 침전물을 제거한 다음, 직경 0.45 μm의 구멍(pore size)을 가진 막(filter)으로 여과하여 부유성분을 제거하고 동결건조 하여 얻어냈다. 동결 건조한 후 수득물을 조사하였고, 사용 시 직경 0.25 μm의 구멍을 가진 막으로 여과 멸균하여 사용하였다.

### 2. NFAT(Nuclear factor of activated T cell) reporter assay

NFAT에 대한 억제활성을 SEAP assay 변형을 통하여 측정한다. NFAT dependent transcriptional reporter gene인 pCMV/SEAP를 함유한 Jurkat Cell Line을 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 IMDM으로 배양한다. 본 NFAT reporter gene Jurkat Cell Line은 연세대학교에서 기탁 받았다.

NFAT 세포의 분주는  $1 \times 10^4$  cells/well 로 하였고, T세포 자극을 위해 PMA(10 ng/mL)와 Ionomycin(1 μM)을 사용하였다. 면역억제 효과를 나타내는 CsA를 대조군으로 하였다. 각 시료는 농도별로 분주된 세포주와 함께 37°C에서 18시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양한 후 배양액을 원심분리하고, 상층액 50 μL에 200 μL의 SEAP buffer(1 M diethanolamine, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM homoarginine)와 기질(p-nitrophenyl phosphate 120 mM)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, Microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전사인자 NFAT에 대한 억제효과는 세 번 반복 실험한 평균값을 이용하여 대조군에 대한 억제율로 계산하였다. 양성대조군은 칼시뉴린의 탈인산효소 활성을 차단하는 CsA(IC<sub>50</sub> :  $2.4 \times 10^{-7}$  M)를 사용하였다.

### 3. MTT assay

세포배양용 96 well plate에 준비된 세포를  $2 \times 10^4$ 개/mL로 희석한 세포액을 100 μL/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 후보물질 및 세포독성 유발 약물을 배지에 희석하여 처리한 후 적정 시간이 경과하면 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/mL 농도로 희석하여 200 μL씩 분주하고 3

시간 동안 배양한다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100μL씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) 억제능 검색

Responder cell은 C57BL/6 마우스의 비장세포를 사용하였다. ficoll-gradient 법을 사용하여 비장 조직에서 림프구를 분리하였다. Stimulant cell은 mitomycin C로 처리한 BALB/c 마우스의 비장세포를 사용하였다. 한 well당 responder cell과 stimulant cell을  $5 \times 10^5$ 개씩 분주하고 농도별로 구배한 약물을 함께 첨가하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양한 후 각 well에 50 μCi/mL의 3H-thymidine(Amersham)을 20 μL씩 넣고 16시간 배양하였다. 배양한 세포를 16 well cell harvester에서 Glass fiber filter를 사용하여 수득하고, filter를 scintillation fluid가 들어있는 vial에 각각 넣은 후 scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

### 5. Insulinoma 세포주 배양

Insulinoma cell line (RIN-5mF)을 10% FBS (Gibco-BRL, GrandIsland, NY), 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodiumpyruvate, 100U/mL penicillin, 100μg/mL streptomycin을 혼합한 RPMI-1640 (Gibco-BRL, GrandIsland, NY) 배양액에서 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 24-well plate에 well당  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 배양한 후 12시간 후에 세포가 완전히 부착된 후에 사용하였다.

### 6. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

세포를 분주하여 SOE 및 대조군이 함유된 배지에서 배양하였다. PBS로 2회 세척 후 Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD)로 총 RNA를 추출하여 사용하였다. 요약하면, 세포에 1 mL의 Trizol 용액 (Life technologies, USA)을 첨가한 후 실온에서 5분 동안 배양하고, Trizol 용액 1mL당 0.2 mL의 chloroform을 첨가한 후 4°C에서 15분 동안 12,000×g로 원심 분리한 뒤, 상층부의 액상 부위를 새로운 튜브에 옮겨 담은 후 0.5 mL의 isopropyl alcohol을 첨가하고 실온에서 15분간 방치 후 4°C에서 10분간 12,000×g로 다시 원심 분리하였다. 추출한 총 RNA 1 μg에 Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD)를 이용하여 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻은 후 iQ SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)를 이용하여 β-actin에 대한 중합효소 연쇄반응을 시행한 다음 각 유전자 발현 정도를 Real-Time PCR을 이용해 측정하였다. 각 Sample의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) 25 μL와 각각의 유전자들과 10pM forward 그리고 reverse primers를 1 μL씩 첨가하였고, 증류수를 이용하여 총

량을 50 $\mu$ L로 하였으며, 반응은 95°C에서 10분 후 30초간 40 cycle을 시행한 다음 60°C에서 30초 72°C에서 30초 동안 반응시켰다. 대조 유전자는  $\beta$ -actin으로 사용하였다.  $\beta$ -actin mRNA의 발현 정도를 대조로 이용하여 검출하고자 하는 유전자의 mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다.

## 7. SDS-PAGE 및 Western blot

세포를 PBS로 세 번 수세하고, RIPA buffer(50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)를 이용하여 용해하고, 14,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 정량 후 Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동을 하였다. 전기영동 후, gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 한 후, 순차적으로 일차항체 및 이차항체를 처리한 후 발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

## 8. 인슐린 분비능 측정 (Insulin ELISA kit)

RIN-5mF 세포를 well 당  $3.0 \times 10^5$ 개로 12-well plate에 분주하여 완전배지에서 3일간 배양한 후 SOE와 동일한 D-PBS를 첨가하여 1~2일간 배양하였다. SOE를 함유한 배지에서 배양한 후 modified Kreb's ringer bicarbonate 완충액(KRBB-HEPES, 134mmol/L NaCl, 4.8mmol/L KCl, 1mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1.2mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 10mmol/L HEPES, 1mg/mL BSA, pH 7.4)로 2회 세척하고, 5 mM 또는 20 mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 바꾸어 1시간 배양한 후, 상층액을 취하여 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20°C에 보관하여 사용하였다. 분비된 인슐린의 양을 rat insulin RIA kit로 측정하였다. 각 well의 세포 단백질의 농도를 측정하여 단백질 각 단위 그램 당 인슐린 분비량을 계산하였다.

# 결 과

## 1. SOE의 면역억제 활성 확인

면역 활성의 유도 및 조절에 중요한 NFAT는 면역억제제의 중요한 조절 물질이다. 본 실험에서는 NFAT dependent transcriptional reporter gene인 pCMV/SEAP를 함유한 Jurkat T Cell Line을 사용하여 한약재 라이브러리에서 NFAT 전사인자에 대한 우수한 저해 활성을 보인 한약재를 확보하였다. 그 중 SOE를 실험군으로 하여 농도에 따른 효능을 알아보았으며 유의성 있는 결과를 나타냈다(Fig. 1A). NFAT Assay에서 효능을 확인한 SOE를 혼합 림프구 배양 시험(MLR; mixed lymphocyte reaction)으로 면역 억제능을 살펴보았다. MLR은 T세포가 이종주요표면항원을 인식하여 활성화되므로 이러한 이종주요표면항원의 인식 능력을 측정하는 방법으로써 림프구를

채취한 개체간의 조직적합항원의 차이로 면역 억제 능력을 평가할 수 있다. 실험 결과 서로 다른 개체의 림프구를 섞은 대조군에서는 반응이 증가하여 thymidine uptake rate가 3배 이상 증가됨을 확인하였다. 음성 대조군으로는 대표적 면역 억제물질인 CsA를 사용하였다. 실험 결과 유의성 있는 효능을 확인하였다(Fig. 1-B). 또한, NFAT은 IL-2의 전사인자로서, IL-2 생성을 RT-PCR과 ELISA를 이용하여 확인하여 본 바 IL-2의 생성 억제됨을 확인하였다(Fig. 2).

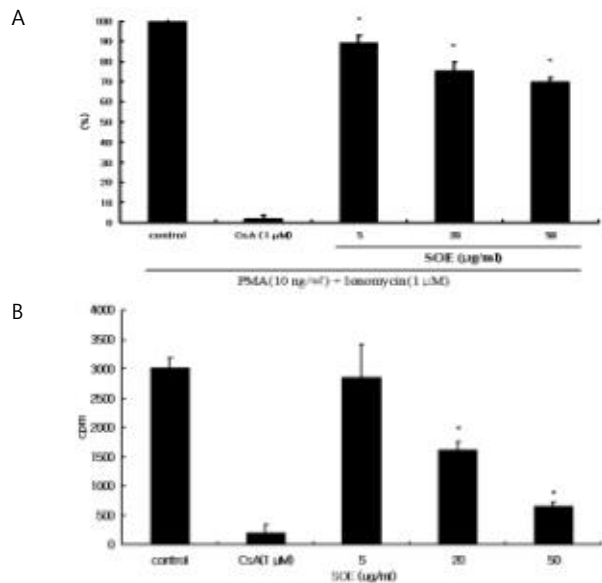


Fig. 1. Effect of SOE on NFAT reporter assay(A) & MLR(B). (A) Stimulated with PMA(10 ng/ml) and Ionomycin(1  $\mu$ M) and 5 or 20, 50  $\mu$ g/ml of SOE was added. After 8 hr of cell incubation, SEAP expression levels analyzed. (B) tritium-labeled thymidine incorporation was determined. SOE showed concentration-dependent inhibition of MLR. Results are mean  $\pm$  SD (n=5). \*p < 0.05 versus control group.

## 2. 인슐린 분비능

면역억제제인 CsA와 FK506, 당질코르티코이드(Dexamethasone) 그리고 SOE를 첨가 배양한 RIN-5mF 세포를 2일 동안 배양한 후 인슐린 분비능에 미치는 효과를 알아보았다. 대조군과의 차이는 SOE의 농도에 따라 인슐린의 분비량이 농도-의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

## 3. 포도당 자극과 SOE에 의한 인슐린 분비

RIN-5mF 세포를 SOE를 함유한 배지에서 2일 동안 배양하여 만성적으로 고농도 포도당에 노출되었을 때 인슐린 분비능에 미치는 효과를 알아보기 위해 포도당 자극 인슐린분비(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)를 측정하였다. 저농도 포도당(5mM) 그리고 고농도 포도당 자극(20mM)에 의한 인슐린 분비를 각각 측정하였다. 저농도 포도당의 경우  $19.32 \pm 0.26$ ng/mg protein/1h 이었으나, 고농도 포도당의 경우에는  $13.00 \pm 0.11$ ng/mg protein/1h로 감소하였다. SOE를 첨가 배양한 세포 대조군과의 차이는 SOE의 농도에 따라 인슐린의 분비량이 증가하는 것으로 확인되었다.

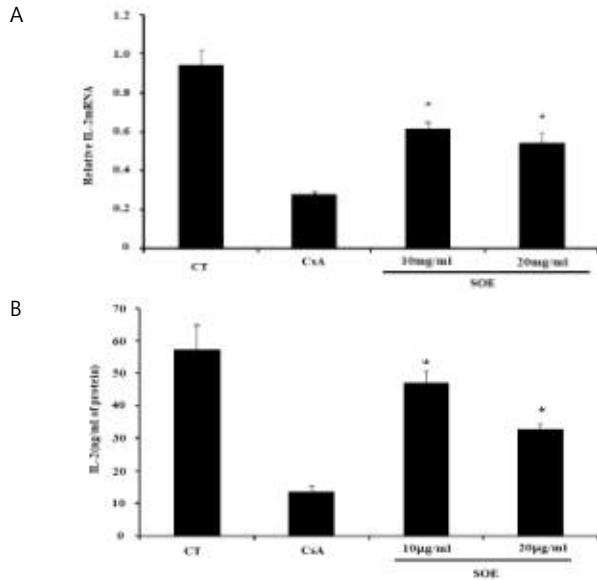


Fig. 2. Effect of SOE on IL-2 mRNA & ELISA in NFAT-Jurkat T Cell Line. Stimulated with PMA(10 ng/ml) and Ionomycin(1 µM) and 10, 20 µg/ml of SOE was added. (A) The expression levels of IL-2 mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The IL-2 mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. (B) The IL-2 expression of protein levels. Values are means ±SD. \* P < 0.05.

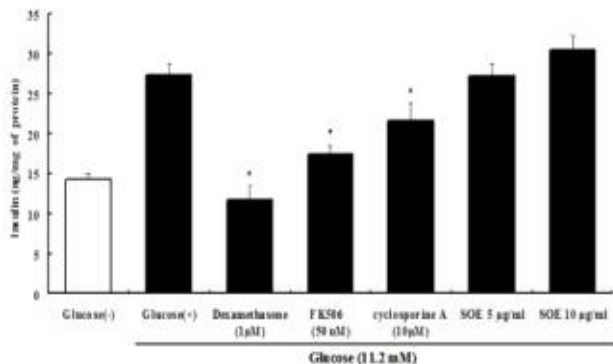


Fig. 3. Effect of SOE on insulin secretion in RIN-5mF cells. Glucose responsiveness is suppressed by immunosuppressant pretreatment. RIN-5mF cells were treated with 50 nM tacrolimus, 10 µM CsA, SOE or nothing for 60 min in complete RPMI-1640 media. Data shown ± S.D. \* P < 0.05.

4. SOE가 인슐린 분비 관련 유전자 발현에 미치는 영향

SOE가 INS-1/2 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SOE를 함유한 배지에서 2일간 배양한 후 INS-1/2 mRNA를 측정하였다. INS-1/2 mRNA 발현은 각각 SOE의 농도에 따라 증가하였다(Fig. 5).

5. SOE와 인슐린 분비 관련 유전자 발현 여부 비교

SOE가 인슐린 분비에 관여하는 여부를 조사하기 위해 insulinoma cell line인 RIN-5mF를 사용하였다. SOE가 INS-1/2, HNF-1α/4a mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CsA, FK506, SOE를 각각 함유한 배지에서 배양한 후 INS-1/2, HNF-1α/4a mRNA를 측정하였다. CsA, FK506과는

달리 SOE가 INS-1/2, HNF-4α mRNA 발현을 억제하지 않음을 보이며 인슐린의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 6). HNF-1α 발현은 변화가 없음을 확인하였다.

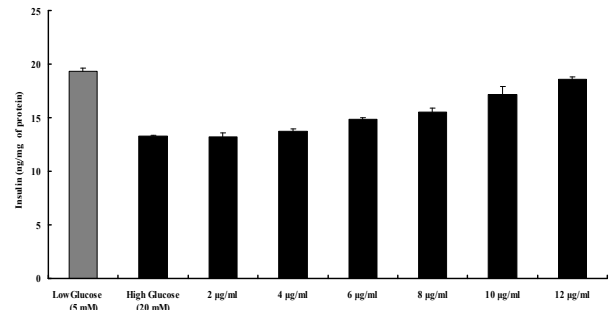


Fig. 4. Effect of SOE on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in RIN-5mF cells. After the cells were cultured with or without SOE for 2 days, and then cultured in KRBB-HEPES containing 5 mM and 20 mM glucose for 1 hours. Insulin content was measured from RIN-5mF cells cultured in RPMI 1640 media containing glucose in the SOE 12 µg/ml for low glucose and high glucose. Insulin amount was normalized by total protein amount in the cell lysates. Values are means ± SEM. \* P < 0.05 versus cells with vehicle in 5 mM glucose and 20 mM glucose.

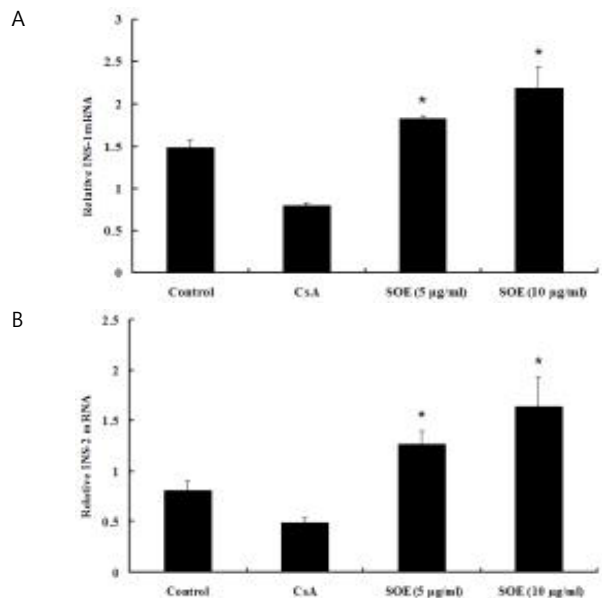


Fig. 5. Effect of SOE on INS-1(A) and INS-2(B) mRNA in RIN-5mF cells. The expression levels of insulin mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The RIN-5mF mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ±S.D. \* P < 0.05.

6. Insulinoma cell line에서의 HNF 단백질 발현 비교

HNF-1α와 HNF-4α의 단백질 Western blot 분석과 RT-PCR 후의 mRNA의 발현비교 결과에서 대조군과 CsA군, FK506군 간에 있어서 서로의 차이를 발견할 수 있었다. 그러나 SOE의 경우 HNF-4α 단백질의 양적 변화는 증가함을 알 수 있었고, HNF-1α의 경우 대조군에 비해 변화를 확인할 수 없었다. 즉 기존 면역억제제인 CsA와 FK506의 경우 HNF-4α 감소

확인할 수 있었으나, SOE의 경우 감소를 확인할 수 없었다. 다만 HNF-1 $\alpha$ 의 경우 대조군과의 비교에서는 발현의 차이를 확인할 수 없었다.

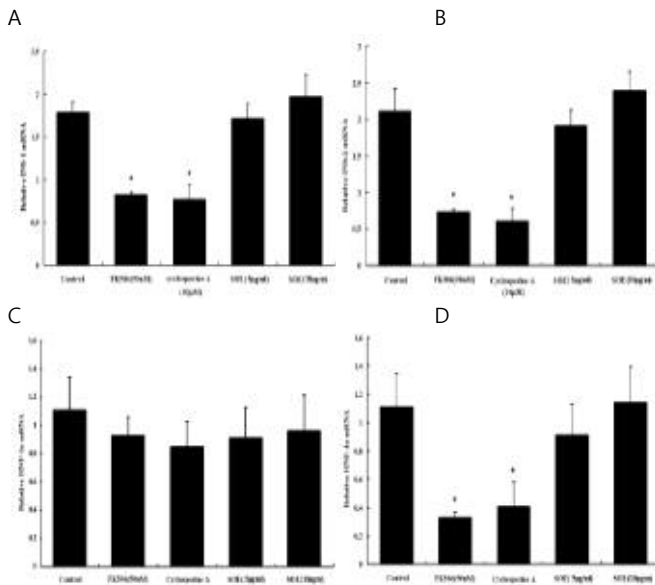


Fig. 6. Effect of SOE on INS-1(A), INS-2(B) & HNF-1 $\alpha$ (C), HNF-4 $\alpha$ (D) mRNA in RIN-5mF cells. The expression levels of insulin mRNA and  $\beta$ -actin were analyzed by real-time RT-PCR. The RIN-5mF mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means  $\pm$ S.D. \* P < 0.05.

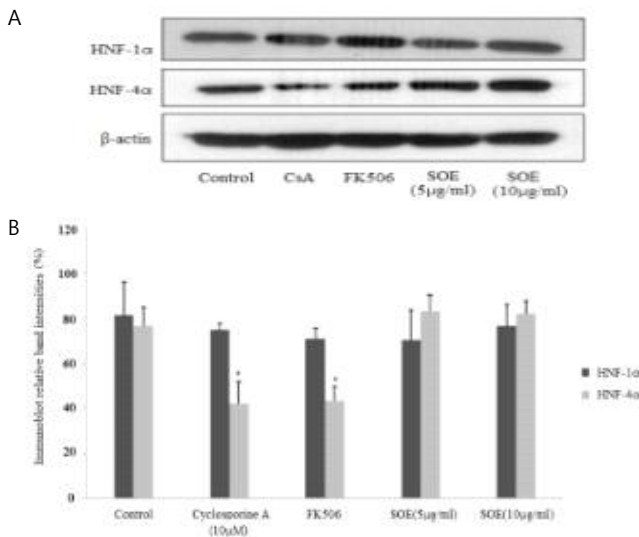


Fig. 7. The expression of HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  in RIN-5mF cells was measured by immunoblotting. (A) Representative immunoblots images for HNF-1 $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  protein (B) Densitometric quantifications of band intensities.

## 고찰

대표적인 면역억제제인 CsA와 FK506는 칼시뉴린/NFAT 신호 억제 작용을 갖기 때문에 다양한 유전자 발현에 영향을 미치게 된다. 특히, 인슐린 유전자에서 NFAT는 필수적인 조절인

자로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>13</sup>. NFAT 단백질은 췌장 베타세포의 인슐린 프로모터에 작용하여 인슐린 발현을 조절하며 증진시킨다. 이러한 증거로는 베타세포에서 칼시뉴린 Knockout(KO) 마우스를 이용하여 NFAT 활성화를 유도하면 인슐린 분비, 베타세포의 증식과 크기 회복을 일으키며 KO 마우스의 당뇨 발병을 방지한다는 보고와 칼시뉴린 불활성화에 의한 베타세포의 결손이 NFATc1의 발현으로 복구시킨다는 연구<sup>14</sup>)를 통해 NFATc 단백질이 베타세포의 칼시뉴린에 매우 결정적인 역할을 하며, 베타세포의 4가지 NFATc 단백질(NFATc1-c4) 발현은 칼시뉴린에 의해 활성화됨을 설명하였다<sup>15</sup>).

이전의 많은 임상 연구들에서 신장 이식 후 첫 1년간 PTDM 발생률은 2~50%로 연구마다 매우 차이가 있는 것으로 보고되고 있으며, PTDM의 발생과 관련 있는 다양한 위험 인자 즉 연령, 가족력, 인종, 면역억제제, 뇌사공여자, 조직적합도 (HLA), 비만, C형 간염 등<sup>16-24</sup>)도 알려지고 있다. 그러나 PTDM의 발생률, 위험 인자 등은 각각의 연구에서 사용된 PTDM의 정의와 연구가 수행된 기간에 따라 결과가 매우 다양하여 아직까지 그 원인에 대한 연구는 진행 중이다.

PTDM 발병 기전에서 가장 중요한 인슐린 분비와 저항성에 관해서는 아직까지 많은 연구가 진행되지 않았으며 따라서 정확한 기전이 규명되지 못하고 있다. 다만, 인슐린 저항성의 증가와 인슐린 분비의 원인이 주요한 인자라 여겨지고 있다<sup>25,26</sup>).

당뇨병은 다양한 병인에 의해 발생하지만 여러 당뇨병의 형태 중에서 유전적 결손이 확인된 당뇨병인 Maturity Onset Diabetes of Youth (MODY) 증후군은 상염색체 우성유전에 의해 발생하는 베타세포의 결함과 인슐린분비의 손상으로 발생하는 당뇨병(전체 당뇨병의 1-2%)으로서 여섯 개의 유전자에서 발견되는 돌연변이들이 MODY 증후군들의 대부분을 차지한다. 이들 유전자들은 transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ /MODY1), glucokinase (GCK/MODY2) transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ /MODY3), insulin promotor factor 1 (IPF-1/MODY4), transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ /MODY5), Neuro D1로서 인슐린 분비 세포 발달의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>). 특히, HNF-1 $\alpha$ 와 HNF-4 $\alpha$  유전자는 여러 유전자 프로모터에 결합하는 전사인자로서 당대사에 관련된 다양한 유전자의 발현을 조절하고, 이 유전자의 변이는 인슐린 분비 장애를 유발한다.

HNF-4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4alpha)는 췌장의 베타세포, 간세포, 신장세포 등에 존재하는 전사인자로서 포도당의 이동과 대사에 작용하는 여러 단백질의 발현을 조절하고, 췌장 베타세포의 발생과 분화를 조절함으로써 인슐린 분비를 조절하며, HNF-1 $\alpha$ 의 발현에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>28-31</sup>). HNF-4 $\alpha$  유전자 변이의 당뇨병 유발기전에 대하여서는 아직 밝혀진 바는 없으나 HNF-4 $\alpha$  유전자 변이가 있는 경우 포도당의 이동과 분비에 관여하는 glucose transporter 2, aldolase B, liver pyruvate kinase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase 등의 유전자 발현이 정상적으로 이루어지지 않

음이 관찰되었다<sup>30</sup>). 이로 미루어 HNF-4 $\alpha$  유전자가 인슐린 분비에 관여하는 하부 유전자들의 발현에 직간접적으로 관여함으로써 당뇨병을 유발함을 알 수 있음이 보고되었다. 또한, HNF-4 $\alpha$ 는 인슐린 분비뿐만 아니라 지질 대사에 있어서도 중요한 역할을 한다는 것은 다른 여러 연구에서 밝혀져 있다<sup>33,34</sup>).

최근 연구에 의하면 PTDM의 유발에 있어서 HNF-4 $\alpha$ 와 HNF-1 $\alpha$ 의 중요함이 밝혀졌는데, 사이클로스포린(CsA)를 투여 받은 환자군에서 HNF-4 $\alpha$  발현이 낮을수록 PTDM의 유발이 증가함을 확인하였다<sup>35</sup>). 이와 같이 HNF-4 $\alpha$  전사인자는 당뇨병과 연관되어 인슐린 분비에 문제를 야기할 수 있는 많은 유전자들의 발현과 베타세포발달의 과정을 포함하는 복잡한 생물학적 기전을 가지고 있다.

본 연구에서는 지유와 대표적 면역억제제인 CsA, FK506으로 면역억제능과 함께 인슐린 분비능 및 HNF-4 $\alpha$  유전자의 발현 등을 비교해 보았다. Fig. 1-B의 MLR data에서 지유는 CsA와 유사하게 thymidine uptake rate를 떨어뜨리는 효과를 나타냈으며, 그 효과는 지유의 농도에 비례하였다. 그리고 Fig. 2에서 지유를 처리한 군에서도 역시 다른 면역억제제를 처리한 군에서처럼 IL-2의 유전자 발현과 단백질 발현이 줄어드는 모습을 나타냈으며 그 감소폭은 지유의 농도에 비례하는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 실험 결과에서 알 수 있는 지유의 면역억제 능력은 Fig. 1-A의 NFAT reporter assay 실험의 결과로 판단할 때 CsA, FK506과 유사하게 NFAT를 억제하는 기전에 의함을 알 수 있다.

인슐린 분비능에 있어서 Fig. 3에서는 실제 인슐린 분비량이 insulinoma cell에 CsA, FK506을 처리한 군보다 많음을 알 수 있고, Fig. 4에서 보듯이 세포에 처리한 지유의 농도가 높아짐에 따라 인슐린 분비량도 많아짐을 알 수 있다.

인슐린 관련 유전자 발현에 대한 CsA, FK506과 지유의 비교에서, 지유는 Fig. 5에서 보는 것처럼 CsA, FK506과는 달리 INS-1/2 유전자를 억제하지 않으며 오히려 고농도에서는 INS-1/2 유전자 발현을 촉진하는 결과를 나타냈다. HNF-4 $\alpha$  유전자 발현은 CsA, FK506을 처리한 군에서는 억제된 반면 지유를 처리한 군에서는 억제되지 않음을 알 수 있었다.

## 결 론

이상의 결과로 볼 때, 지유는 대표적 면역억제제인 CsA와 FK506(Tacrolimus)과 비슷한 기전의 면역억제 기능을 갖고 있으나 인슐린 억제 효과는 갖고 있지 않으며, 다른 면역억제제와는 달리 인슐린 분비 및 여러 당대사에 핵심적으로 작용하는 유전자인 HNF-4 $\alpha$  억제 효과 역시 갖고 있지 않은 것을 알 수 있다. HNF-4 $\alpha$ 는 PTDM 등 면역억제와 인슐린 분비에 모두 관여하는 유전자로 알려져 있어<sup>35</sup>) 최근 관련 연구가 많이 진행되고 있다. 지유도 HNF를 조절함으로써 인슐린 유도를 진행하는 것으로 보이며 향후 지유의 면역억제 기전을 규명하고 PTDM의 예방과 치료에 대한 연구를 위해 in vivo 등의 실험을 추진하고자 한다.

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(No. 2010-0022019)

## References

1. Yun, Y.S. Immunosuppressant in Kidney transplantation. *Kidney Research and Clinical Practice*:13(supplement 8), pp 66-85, 1994.
2. Kim, E.S., Kim, Y.I., Song, J.G. Immunosuppressant. In-depth data analysis report. KISTI, pp 25-26, 2003.
3. Dambrin, C., Klupp, J., Morris, R.E. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Current opinion in Immunology* 12: 557-562, 2000.
4. Miles, A.M., Sumrani, N., Horowitz, R., Homel, P., Maursky, V., Markell, M.S., Distant, D.A., Hong, J.H., Sommer, B.G., Friedman, E.A. Diabetes mellitus after renal transplantation. *Transplantation* 65: 380-384, 1998.
5. Herbal Medicine, Seoul, Young rim, p 434, 20070
6. Lim, J.P. Herb biochemistry. Sinil books. 247, 2003.
7. Jin, J.P., Jang, J.S. Dictionary of Medical Herb for edible & medicinal, Bubin Publishers Co., Seoul, 2013.
8. Kang, B.S., Ko, U.C., Kim, S.H., No, S.H., Shin, Y.B., Song, H.J., Shin, M.G., Ann, D.G., Lee, S.I., Lee, Y.J., Lee, T.H. and Ju, Y.S. Collaboration with a national college of oriental medicine herbology professor association. In *Herbology*. Yonglim Press, Seoul, Korea. pp 392-393, 1994.
9. Biemond, P., Swaak, A. J., van Eijk, H. G. and Koster, J. F. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory disease. *Free Radic. Biol. Med.* 4: 185-198, 1988.
10. Yoshihiro, M., Masato, F., Akihito, Y., Yukata, S., Shigenori, F. and Hiroshi, S. Triterpene glycosides from the roots *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* 57, 773-779, 2001.
11. Kokoska, L., Polesny, Z., Raba, V., Nepovim, A. and Vanek, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 82: 51-53, 2002.
12. Elena, A.G., Petrichenko, V.M., Solodnikov, S.U., Suhinina, T.V., Kline, M.A., Glenn, C., Chi, N. and Howard, M. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J. Ethnopharmacol.* 81: 337-342, 2002.

13. Michael C. Lawrence, Harshika S. Bhatt, Jeannette M. Watterson, And Richard A. Easom: Regulation of Insulin Gene Transcription by a Ca<sup>2+</sup> Responsive Pathway Involving Calcineurin and Nuclear Factor of Activated T Cells. *Molecular Endocrinology* 15(10):1758-1767, 2001.
14. Heit, J.J., Apelqvist, A.A., Gu, X., Winslow, M.M., Neilson, J.R., Crabtree, G.R., Kim, S.K. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature*. 443(7109):345-349, 2006.
15. Heit, J.J. Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics. *Bioessays*. Oct: 29(10):1011-1021, 2007.
16. Boudreaux, J.P., McHugh, L., Canafax, D.M., Ascher, N., Sutherland, D.E., Payne, W., Simmons, R.L., Najarian, J.S., Fryd, D.S. The impact of cyclosporine and combination immunosuppression on the incidence of posttransplant diabetes in renal allograft recipients. *Transplantation* 44: 376-381, 1987.
17. Hur, K.Y., Kim, M.S., Kim, Y.S., Kang, E.S., Nam, J.H., Kim, S.H., et al. Risk factors associated with the onset and progression of posttransplantation diabetes in renal allograft recipients. *Diabetes Care*, 30: 609-615, 2007.
18. Arner, P., Gunnarsson, R., Blomdahl, S., Groth, C.G. Some characteristics of steroid diabetes: a study in renal transplant recipients receiving high-dose corticosteroid therapy. *Diabetes Care* 6: 23-25, 1983.
19. Gunnarsson, R., Arner, P., Lundgren, G., Magnusson, G., Ostman, J., Groth, C.G. Diabetes mellitus a more common than believed complication of renal transplantation. *Transplant Proc* 11: 1280-1281, 1979.
20. McIntyre, E.A., Walker, M. Genetics of type 2 diabetes and insulin resistance: knowledge from human studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57: 303-311, 2002.
21. Sumrani, N.B., Delaney, V., Ding, Z.K., Davis, R., Daskalakis, P., Friedman, E.A., Butt, K.M., Hong, J.H. Diabetes mellitus after renal transplantation in the cyclosporine era-an analysis of risk factors. *Transplantation* 51: 343-347, 1991.
22. Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D., Matas, A.J. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 3: 178-185, 2003.
23. Reisaeter, A.V., Hartmann, A. Risk factors and incidence of posttransplant diabetes mellitus. *Transplant Proc* 33(suppl 5A):8S-18S, 2001.
24. David, D.S., Cheigh, J.S., Braun, D.W., Jr. Fotino, M., Stenzel, K.H., Rubin, A.L. HLA-A28 and steroid-induced diabetes in renal transplant patients. *JAMA* 243: 532-533, 1980.
25. Ekstrand, A.V., Eriksson, J.G., Gronhagen-Riska, C., Ahonen, P.J., Groop, L.C. Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of posttransplantation diabetes in man. *Transplantation* 53: 563-569, 1992.
26. Midtvedt, K., Hartmann, A., Hjelmeth, J., Lund, K., Bjerkely, B.L. Insulin resistance is a common denominator of post-transplant diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 13: 427-431, 1998.
27. Hwang, J.S. MODY Syndrome. *Journal of Korean Society of Pediatric Endocrinology*, 15(1):1-6, 2010.
28. Wang, H., Malchler, P., Antirlozzi, P.A., Hagenfeldt, K.A. HNF-4 $\alpha$  regulates the expression of pancreatic beta cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J. Biol Chem* 275: 35953-35959, 2000.
29. Rissanen, J., Wang, H., Miettinen, R., Karkkainen, P., Mykkanen, L., Kuusisto, J., Karhapaa, P., Niskanen, L., Uusitapa, M., Laakso, M. Variants in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  and 4 $\alpha$  genes in Finnish and Chinese subjects with late-onset type2 diabetes. *Diabetes care* 23: 1533-1538, 2000.
30. Stoffel, M., Duncan, S.A. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF-4 $\alpha$  regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 94: 13209-13214, 1997.
31. Heman, W.H., Fajans, S.S., Smith, M.J., Polonsky, K.S., Bell, G.I., Halter, J.B. Diminished insulin and glucagons secretory responses to arginine in nondiabetic subjects with a mutation in the hepatocyte nuclear factor 4A/MODY 1 gene. *Diabetes* 46: 1749-1754, 1997.
32. Cereghini, S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10: 267-282, 1996.
33. Lehto, M., Bitzen, P.O., Isomaa, B., Wkperno, C., Wessman, Y., Forsblom, C., Tuomi, T., Taskinen, M.R., Groop, L. Mutation in the HNF-4 $\alpha$  gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* 48: 423-425, 1999.
34. Borlak, J., Niehof, M. HNF4 $\alpha$  and HNF1 $\alpha$  dysfunction as a molecular rationale for cyclosporine induced posttransplantation diabetes mellitus. *PLoS One*. 4(3):e4662, 2009.