

Rutin이 H4IIE 간세포에서 지질축적에 미치는 영향

이호원¹, 박덕배^{1,2}

¹제주대학교 의학전문대학원 의학과, ²조직학교실

(Received October 10, 2014; Revised October 17, 2014; Accepted October 24, 2014)

Abstract

Effect of rutin on the accumulation of lipid in H4IIE hepatoma cells

Ho-Won Lee¹, Deok-Bae Park^{1,2}

²Laboratory of Histology, ¹Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Rutin is a flavonoid compound present within various plants. Previous studies have suggested that rutin has a potential anti-diabetic and a anti-cancer activity in a few experimental models. However, it is uncertain that rutin can affect hepatic lipid accumulation, which is a pathophysiological marker of steatohepatitis (fatty liver) in metabolic syndrome. The present study investigated the effect of rutin on the intracellular accumulation of lipid induced by palmitic acid in H4IIE rat hepatoma cells. Rutin significantly suppressed palmitic acid-induced lipid accumulation whereas other flavonoid compound (hesperidin) did not. Protein content of the key enzyme in the biosynthesis of triglyceride, FAS, was decreased by rutin. The number of intracellular lipid droplets was also suppressed by rutin. Taken together, rutin has a strong anti-lipogenic activity, indicating the pharmacological potential to treat one of metabolic syndrome. (*J Med Life Sci* 2014;11(2):105-108)

Key Words : rutin, lipid accumulation, H4IIE hepatoma cells

서론

Rutin (3,30,40,5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) 은 메밀, 사과, 감귤들과 같은 곡류, 과일, 야채들에 포함되어 있는 flavonoid 화합물의 하나이다. Rutin은 비타민 P로도 알려져 있는데¹⁾, 야채와 과일에 풍부하게 존재하는 flavonoid인 quercetin의 주요 glycoside 유도체 (3-Orhamnoglucoside) 형태이다²⁾. Rutin은 고혈당을 갖고있는 흰쥐에서 인슐린 분비를 증가시켜 혈중 포도당 농도를 감소시키며 흰쥐의 체장 베타세포에서 칼슘의 흡수를 자극하는 것으로 있다³⁾. 또한 최근의 보고에 의하면 고농도의 탄수화물과 지질섭취로 유발된 대사증후군이 rutin의 장기간 섭취로 개선되었는데 이때 심장과 간에서 산화스트레스와 염증현상이 억제되는 것으로도 알려졌다⁴⁾. 그 밖에도 당뇨병모델의 실험동물에서 rutin이 여러 체내 장기들의 병리현상들을 개선시키거나 외부의 스트레스로부터 보호하는 효과들이 보고되었는데⁵⁾, 간조직에서 rutin이 어떤 생리활성 조절 기능을 갖고 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

비알콜성지방간병 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

은 가장 일반적인 간질환으로서 중성지질 (triglyceride) 함량이 전체 간 무게의 5%를 초과할 경우로 정의된다⁶⁾. NAFLD 유병률은 연구결과에 따라 다양하게 나타난다. 서구인의 경우 20-30%의 유병률을 보이며^{7,8)} 특히 비만이나 인슐린비의존형당뇨병의 경우 25-75%에 달한다^{9,10)}. 인슐린저항성을 가진 환자의 간에서는 인지되지 않는 손상이 빈번히 일어나는데 이러한 만성간손상은 인슐린 저항성이 점차 악화되는 과정에서 지속적으로 조용하게 진행되다가 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 혈관질환과 같은 대사증후군이 명확해질 시점에 비로소 지방간염 (steatohepatitis)과 간경화 (cirrhosis)로 진행된다. 따라서 간조직을 비롯한 체내 지질축적을 예방 또는 억제하기 위한 생리활성물질을 탐색하는 것은 지방간염을 개선하므로써 대사증후군의 진단과 간경화로의 진행을 억제하는 데 필요한 새로운 약제의 발굴에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

본 연구에서는, 비만이나 대사증후군의 한 현상인 간세포내 지질축적에 rutin이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에서는 흰쥐의 간암세포주인 H4IIE 세포를 세포주은행 (서울)로부터 공여받아 사용하였다. 세포는 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)

Correspondence to : Deok-Bae Park
Department of Histology, Jeju National University School of Medicine,
Aran 13gil 15, Jeju-si, Jeju Special Self-governing Province,
Republic of Korea, 690-767
E-mail : parkdb@jeju.ac.kr

이 포함된 Dulbecco's Minimal Essential Medium (D-Mem) 배양액을 사용하였으며 5% CO₂ 및 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 T75 배양용기에서 배양된 후 실험목적에 따라 24-well 또는 6-well 배양접시에 옮겨 사용하였다. 배양접시 안에서 80-90% 정도의 세포밀도에 도달하였을 때 우태아혈청이 제거된 serum-free 배양액으로 바꾸어 24 시간동안 전배양 (serum-starvation)하고 Dubelcco's phosphate-buffered saline (D-PBS)로 2회 세척한 후 혈청이 없는 신선한 D-Mem으로 옮겨 실험에 사용하였다.

MTT assay

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

중성지질 측정 및 Nile red 형광염색

세포내 중성지질의 함량은 Cleantech사의 TG-S 측정키트 (Asan Pharm, Korea)를 사용하였다. 6-well 배양접시에서 시료의 처리가 끝난 H4IIE 세포를 rubber scrapper를 사용하여 떼어낸 후 원심분리하여 배양액을 제거하였으며 세포분획을 D-PBS로 1회 세척하였다. 0.2 ml의 5% Triton X-100 용액으로 균질화한 후 90°C에서 5분간 가열하고 난 뒤 실온에서 냉각하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 측정키트의 실험절차에 따라 중성지질 농도를 측정하였다. 한편 세포 안에 축적되어 있는 지질공포는 Nile red를 사용하여 형광염색하였다. 배양과 처리가 끝난 세포를 D-PBS로 세척한 후 Nile red 희석용액(200 ng/ml in 2% acetone)에 15분간 정치한 후 여분의 Nile red 용액을 제거하고 형광현미경(IX70, Olympus, Japan)으로 관찰하고 형광카메라(예-70, Olympus, Japan)를 사용하여 촬영하였다.

전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 직접 5%의 2-mercaptoethanol을 포함한 cell lysis buffer⁹⁾에 녹여 균질화시켰다. 70°C에서 10분간 가열하고 4-20%의 polyacrylamid gel에 전기영동하고 poly(vinylidene difluoride)(PVDF)에 흡착시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer(Tris-buffered saline-0.1%(w/v) Tween-20) (TBS-T)으로 상온에서 1시간동안 반응시키고 난 뒤 여러가지 1차 항체 (1:1000-1:3000)가 들어있는 TBS-T에서 1시간(25°C) 또는 16시간(4°C)동안 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated 2차 항체와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence(ECL) 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

통계분석

대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성은 student's t-test를

사용하였고 *p* 수치가 0.05 이하일 경우 통계적 유의성을 부여하였다.

결과 및 고찰

감귤류의 과피에는 flavonoids(naringin, hesperidin, rutin), alkaloids (synephrine, tyramine, octapamine), polymethoxy flavones (tangeritin, nobiletin)들과 같은 다양한 생리활성물질들이 포함되어 있으며 이들 활성물질들이 다양한 질환별 실험모델에서 어떤 기능을 갖는 지에 대한 연구들이 활발하게 시도되고 있다. 본인의 이전 연구에서도, rutin을 포함하여 다양한 flavonoids를 함유하고 있는 감귤과피 추출물이 간세포에서 포도당생성을 억제하는 지를 보고한 바 있다¹¹⁾. 그 결과 과피추출물은 간세포의 포도당생성을 약 30% 억제하였으며 이후에 수행된 연구결과로부터 감귤과피내 다량 함유되어 있는 alkaloid 화합물인 synephrine이 효과적으로 포도당생성을 억제하는 것으로 나타났다¹²⁾. 그러나 동일한 연구에서 synephrine은 간세포 내 지질축적을 억제하지는 못하였다¹²⁾.

이러한 결과로부터, 본 연구에서는 감귤과피에 포함되어 있는 rutin이 간세포에서 지질축적을 억제하는 지를 조사하였다. 6-well 배양접시에서 배양된 H4IIE 세포를 혈청이 제거된 배양액 (D-Mem, 1g/L glucose)에서 24 시간동안 전배양 한 후 0.1 mM palmitic acid를 30분간 전처리하고 난 뒤 각각 50 mM의 synephrine과 hesperidin, rutin을 처리하고 24 동안 계속 배양하였다. 처리 후 세포내 중성지질의 함량은 0.1 mM palmitic acid 처리로 약 2배 증가하였는데, synephrine과 hesperidin의 처리는 palmitic acid 처리로 유도된 중성지질의 증가를 억제하지 못하였다 (Fig. 1). 그러나 rutin은 palmitic acid 처리로 유도된 중성지질의 증가를 약 30% (*P*<0.05) 감소시켰다. 이러한 rutin의 지질축적 억제가 세포내 중성지질 합성의 주요효소인 fatty acid synthase (FAS) 단백질 수준을 조절하여 매개되는 지를 확인하기 위하여 Western blot analysis로 세포내 FAS 단백질 수준을 비교하였다 (Fig. 2). 아무 것도 처리하지 않은 대조군에 비해 synephrine과 hesperidin 처리는 FAS 단백질 수준에 아무 영향을 미치지 못하였으나 rutin 처리는 현저하게 FAS 단백질 수준을 감소시켰다. Rutin 처리에 의한 간세포내 지질축적 억제가 실제 시각적으로 나타나는 지를 확인하기 위하여 Nile red 형광염색을 시행하였다 (Fig. 3). 세포내 축적된 지질은 과립으로 저장되어 원형의 형광으로 표지되는데, 아무것도 처리하지 않은 대조군의 세포질 안에는 지질과립이 거의 관찰되지 않으나 0.1 mM palmitic acid 처리는 거의 모든 세포의 세포질 내에 지질과립이 관찰되었다. Synephrine이나 hesperidin 처리는 지질과립의 수를 감소시키지 못하였으나 rutin의 처리는 지질과립의 수를 현저하게 감소시켰다. 이러한 결과를 종합하면, 감귤과피 추출물은 간세포내 지질축적을 감소, 또는 억제하는 활성을 가지고 있으며, 그 활성의 일부는 rutin이 매개하고 있는 것으로 사료된다.

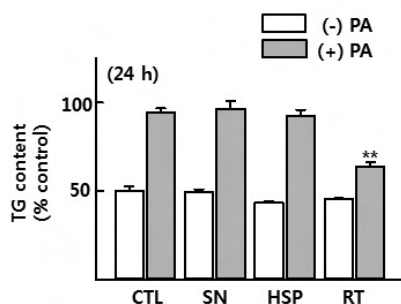


Figure 1. Effect of rutin on the accumulation of lipid in H4IIE cells. Confluent H4IIE cells were preincubated in serum-free medium (1 g/L glucose) overnight and then treated with synephrine (SN, 50 mM), hesperidin (HSP, 50 mM), and rutin (RT, 50 mM) for 24 h. Intracellular triglyceride (TG) content was measured as described in 'materials and methods'. Each bar is a mean \pm SE of 3 experiments. ** $p < 0.01$.

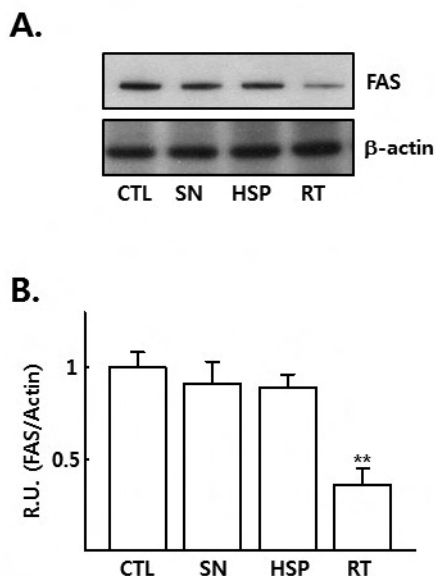


Figure 2. Effect of rutin on FAS levels in H4IIE cells. Confluent H4IIE cells were preincubated in serum-free medium (1 g/L glucose) overnight and then treated with synephrine (SN, 50 mM), hesperidin (HSP, 50 mM), and rutin (RT, 50 mM) for 24 h. (A) Protein content of FAS was measured by Western blot analysis as described in 'materials and methods'. (B) Intensity of each band of FAS protein was normalized with that of β -actin. Each bar is a mean \pm SE of 3 experiments. ** $p < 0.01$.

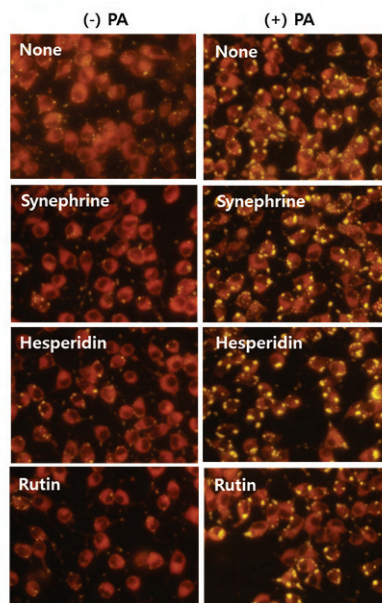


Figure 3. Effect of rutin on the formation of cytoplasmic lipid droplets in H4IIE cells. Confluent H4IIE cells were preincubated in serum-free medium (1 g/L glucose) overnight and then treated with synephrine (50 mM), hesperidin (50 mM), and rutin (50 mM) for 24 h. Cytoplasmic lipid droplets were visualized by the fluorescent Nile red dye. Each figure is a representative of 3 experiments.

Rutin이 간세포에서 어떠한 역할을 하는 지에 대해서는 주로 간독성을 유발하는 약제를 간 조직 또는 간세포에 처리한 모델에서 rutin의 처리가 여러 가지 간손상 지표의 증가를 효과적으로 억제하는 지에 대한 연구들이 수행되어 왔다. 사염화탄소에 의해 증가된 여러 가지 염증촉진인자들(NF- κ B, COX-2 등)은 rutin에 의해 억제되며¹³, 알콜에 의한 간손상 지표들도 rutin에 의해 개선되는 것으로 보고된 바 있다¹⁴. 또한 ammonia도 간독성을 유발할 수 있는 위험성이 있는데 rutin은 과량의 ammonia 처리로 증가된 AST, ALT, ALP 수준을 낮추는 효과가 있는 것으로도 보고되었다¹⁵. 간조직 외에도, rutin은 human neuroblastoma 세포의 세포주기를 정지시키고 세포사멸을 일으키는 항암활성이 있는 것으로도 나타났으나¹⁶, 아직은 여러 다양한 암세포에서의 항암활성에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구자의 이전 연구에서도 rutin은 H4IIE 간암세포의 생존에 유의할 만한 영향을 보이지 못하였다¹¹.

종합하면, 본 연구의 결과 여러 식물에 널리 함유되어 있는 flavonoid인 rutin은 간세포에서 중성지질축적을 억제하는 효과를 가지고 있는 것으로 입증되었으며 rutin의 자세한 작용기전과 세포신호전달에 미치는 영향에 대해서는 이후의 후속 연구를 통해 규명될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 1) Ghiasi M, Taheri S, Tafazzoli M. Dynamic stereochemistry of rutin (vitamin P) in solution: theoretical approaches and experimental validation. *Carbohydr Res* 2010;345:1760–1766.
- 2) Manach C, Morand C, Texier O. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995;125:1911–1922.
- 3) Kappel VD, Zanatta L, Postal BG, Silva FR.) Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 2013;532:55–60.
- 4) Panchal SK, Poudyal H, Arumugam TV, Brown L. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *J Nutr* 2011;141:1062–1069.
- 5) Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J Endocrinol Invest* 2014;37:783–788.
- 6) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
- 7) Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387–1395.
- 8) Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44–52.
- 9) Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Engl J Med* 2002;346:1221–1231.
- 10) Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:63–70.
- 11) 이영기, 박덕배. 진귤(*Citrus sunki*) 과피추출물이 H4IIE 간 세포 포도당합성에 미치는 영향. *의생명과학* 2103;10(2):116–119.
- 12) Cui Z, Lee Y, Lee YK, Park D. p-Synephrine suppresses glucose production but not lipid accumulation in H4IIE liver cells. *J Med Food* 2014 (in press).
- 13) Wu CH, Lin MC, Wang HC, Yang MY, Jou MJ, Wang CJ. Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. *J Food Sci* 2011;76:T65–T72.
- 14) Shenbagam M, Nalini N. Dose response effect of rutin a dietary antioxidant on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance—a histopathologic study. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;25:493–502.
- 15) Mahmoud AM. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012;64(7–8):783–789.
- 16) Chen H, Miao Q, Geng M, Liu J, Hu Y, Tian L, Pan J, Yang Y. Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Scientific World Journal*. 2013;29:269165.