

한약재 물 추출물이 간세포 Glucokinase, Pyruvate Dehydrogenase, Acetyl-CoA Carboxylase mRNA 발현에 미치는 영향*

김현숙¹ · 김태우^{1,2} · 김대중^{1,2} · 이재성² · 최면^{1,2§}

강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터,¹ 강원대학교 생명건강공학과²

Effects of medicinal herb water extracts on expression of hepatic glucokinase, pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase mRNA *

Kim, Hyun Sook¹ · Kim, Tae Woo^{1,2} · Kim, Dae Jung^{1,2} · Lee, Jae Sung² · Choe, Myeon^{1,2§}

¹Well-being Bioproducts RIC Center, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

We studied the anti-diabetic effects of medicinal herb water extracts on expression of hepatic glucokinase (GCK), pyruvate dehydrogenase (PDH), and acetyl-CoA carboxylase (ACC) mRNA. The medicinal herbs used for experiments were *Cornus officinalis* (CO), *Paeonia suffruticosa Andrews* (PSA), *Discorea japonica Thunb.* (DJ), *Rehmannia glutinosa* (RG), *Lycium chinense* (LC), and *Pyrus pyrifolia* (PP). For GCK mRNA expression, CO, RG, and LC water extracts exhibited a more effective activity than other extracts. Cells treated with RG and LC water extracts showed an increase in expression of PDH mRNA to 191% and 124%, respectively, compared to control. Expression of ACC mRNA was significantly higher in LC water extract. These data indicate that CO, RG, and LC water extracts stimulates expression of hepatic GCK, PDH, and ACC mRNA. (Korean J Nutr 2013; 46(2): 119 ~ 125)

KEY WORDS: anti-diabetic, glucokinase, pyruvate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase, medicinal herb.

서 론

2형 당뇨병은 현재 세계적으로 급격히 증가하고 있는 추세이다.¹⁾ 2형 당뇨병의 치료는 식이요법 및 약물요법을 적용하는데, 약물의 경우 주로 당 분해 관련 효소를 억제하여 혈당의 급격한 상승을 억제하고 당의 체내 이용을 낮출 수 있는 원리를 이용한다. 그러나 지금까지 개발된 약물의 경우 설사와 복통 등의 부작용을 유발하므로 이를 보완하기 위하여 당뇨조절을 위한 건강기능식품에 대한 개발이 요구된다.

최근 한약재를 이용하여 당대사 관련 효소의 활성을 변화시킴으로서 혈당강하작용을 나타낼 수 있다는 연구들이 몇몇 보고되었다. 홍삼 사포닌 성분은 glucokinase, acetyl-CoA car-

boxylase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase의 활성을 증가시키고 상승된 G6Pase 활성을 낮추어 혈당강하효과를 나타내었다고 하였다.^{2,3)} 구기자 분획물은 당뇨쥐의 glucokinase 활성을 증가시켰으며,⁴⁾ 참당귀 에탄올 추출물은 당뇨로 인해 저하된 glucokinase, acetyl-CoA carboxylase 효소의 활성 회복에 효과적이었다고 하였다.⁵⁾ Takeda 등⁶⁾은 acetyl-CoA carboxylase 활성 증가로 간세포내로 들어온 당이 분해되어 혈당이 감소되었고, Huang 등⁷⁾은 화살나무뿌리 물 추출물 섭취 후 심장조직의 acetyl-CoA carboxylase 활성이 증가되어 항당뇨 소재로서의 가치가 높다고 보고하였다. 한편, 당뇨환자의 인슐린에 대한 내성은 당대사에 관여하는 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase 등의 활성 저하가 그 요인이며, 당뇨

접수일: 2013년 1월 21일 / 수정일: 2013년 2월 6일 / 채택일: 2013년 2월 28일

*This work was supported by grants of the Institute of Bioscience Biotechnology, Well-being Bioproducts Regional Innovation Center, and LINC Project Group in Kangwon National University.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

© 2013 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

병에 있어서 간조직의 glucokinase 유전자 발현 및 glucokinase 효소의 활성감소로 인하여 당대사 이용률이 저하된다고 하였다.^{6,8)} 또한 glucokinase가 활성화되면 혈당은 에너지 생산을 위해 사용되거나 간에 글리코겐으로 저장되기 때문에 혈당이 감소한다고 알려져 있다.⁸⁾ 따라서 당뇨로 인해 활성이 저하된 간세포의 효소 활성을 증가시키는 것은 당뇨병 치료를 위해 매우 중요한 것으로 판단된다.

산수유 (*Cornus officinalis*)는 예로부터 한방에서 수렴, 신경과 신기보강, 강음 등의 효능이 있는 것으로 전해져 오고 있다. 산수유에 대하여 항아세틸콜린 및 항바륨작용,⁹⁾ 동물에서의 항당뇨 및 항산화작용,¹⁰⁾ 혈액내 콜레스테롤 감소작용,¹¹⁾ 항균 및 항산화작용¹²⁾ 등 다양한 약리작용에 대한 연구가 이루어져 왔다. 목단피 (*Paeonia suffruticosa* Andrews)는 한방에서는 소염, 해열, 진통제 등으로 사용하고 있는 중요한 한약재이며, 항돌연변이원성,¹³⁾ 항염증 작용,¹⁴⁾ 항산화 작용,¹⁵⁾ 혈당강하¹⁶⁾에 관한 연구가 보고된 바 있다. 산약 (*Dioscorea japonica* Thunb.) 혹은 참마는 백합목 마과 (Dioscoreace) 식물로 주성분은 전분이고, 이외에도 steroid saponin, allantoin, choline 등이 존재하는 것으로 알려져 있다. 한방에서는 자양작용, 소화촉진, 지사, 진해 등의 치료를 목적으로 사용하고 있고 민간에서는 당뇨병 환자를 포함한 혈당을 염려하는 사람들이 혈당을 올리지 않고 배고픔을 조절하기 위한 목적으로 많이 응용되고 있다.¹⁷⁾ 숙지황 (*Rehmannia glutinosa*)의 약리적 효능으로는 보혈, 강장, 강신, 혈압강하, 체액증진작용이 알려져 있다. Jeong과 Kim¹⁸⁾은 숙지황이 streptozotocin 유발 고혈당 흰쥐의 혈당강하작용이 우수하였다고 보고하였으며, 또한 고혈압 억제효과,¹⁹⁾ 항산화효과²⁰⁾ 등이 보고되었다. 지골피 (*Lycium chinense*)는 가지과 (Solanaceae)에 속하는 구기자나무의 근피를 말린 것으로 약리작용으로는 간보호효과, 항산화효과, 혈당강하작용이 보고되었다.²¹⁻²⁴⁾ 야생배 (*Pyrus pyrifolia*)는 돌배나무 종으로써 한방에서 가래, 기침, 숙취, 해열, 이뇨 및 변비 등의 치료에 사용되어 왔다.²⁵⁾ 특히 배에서 분리된 폴리페놀은 면역강화, 콜레스테롤 감소, 항산화활성 등이 우수한 것으로 보고되어 있다.^{26,27)} 그러나 앞서 소개된 한약재들의 항당뇨 기전에 대한 체계적인 연구는 미비한 실정이며, 건강 기능성 식품에 적용시키기 위한 생리활성의 검색을 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 산수유, 목단피, 산약, 숙지황, 지골피, 야생배 물 추출물을 HepG2 세포 처리한 후 세포내 당의 이용률을 증가시킬 수 있는 주된 효소인 glucokinase (GCK), pyruvate dehydrogenase (PDH) 및 acetyl-CoA carboxylase (ACC) mRNA 발현 정도를 측정하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

산수유, 목단피, 산약, 숙지황, 지골피, 야생배는 춘천시 소재 건재상에서 국내산 시료로 구입하여 수세한 후 10배 증류수를 가하여 60℃에서 24시간 동안 교반하면서 유효성분을 추출하였다. 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 감압농축기 (EYELA, Japan)로 농축하였고, 동결 건조기 (Ilshin FD 8508, Korea)를 이용하여 -70℃에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

세포 배양

인간 간암세포주 HepG2는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받았으며, 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 90% minimum essential medium (MEM, Sigma, St. Louis, USA) 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma, St. Louis, USA)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 생존율

세포 생존율은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 측정하였다.²⁸⁾ HepG2 세포를 96-well plates에 1 × 10⁴ cells/mL 농도로 100 μL 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가되지 않은 배지에 각 시료를 농도별 (0, 100, 250, 500, 1,000, 25,000 mg/L)로 제조한 후 세포에 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 MEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액 (5 mg/mL)을 가하고 37℃에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan을 조심스럽게 제거하였다. 그런 다음 암조건에서 30분간 건조한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, USA)를 100 μL 분주하여 1시간 동안 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

HepG2 세포를 6-well plates에 1 × 10⁶ cells/mL 분주하여 24시간 동안 배양한 후 한약재 물 추출물을 각 농도별로 처리하였고 24시간 동안 더 배양하였다. 각 추출물이 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis buffer를 각 well에 500 μL씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 -70℃ 보관하였다. 보관된 시료를 실온에서 녹인 후 chloroform 200 μL 분주하여 15초간 혼합하였다. 그 후 12,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 isopropanol 500 μL이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000

× g에서 10분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 75 : 25로 섞어 만든 75% ethanol를 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 12,000 × g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 µL씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 µL에 0.1% DEPC를 955 µL 첨가하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 total RNA를 정량하였다.

First-stand cDNA를 합성하기 위하여 SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 이용하였다. Oligo (dT)₁₅ primer (500 µg/mL) 1 µL, dNTP mix (10 mM) 1 µL, 추출한 RNA (2 µg)와 RNase free water로 11 µL을 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 5배 first-stand 완충용액 4 µL, nuclease free water 1 µL, DTT (100 mM) 2 µL, SuperScript III reverse transcriptase 1 µL를 섞어 9 µL씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 1에서와 같다.

RT-PCR

당 대사 관련 주요 효소들의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. Go Taq Green Master 10 µL, nuclease free water 8 µL, forward primer (15 µM)와 reverse primer (15 µM)를 각각 0.5 µL, 합성한 first-stand cDNA 1 µL를 PCR tube에 넣은 후 PCR을 실행하였다. GCK PCR 조건은 94°C에서 4분 (1 cycle), 94°C에서 30초, 62°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초 (21 cycles), 72°C에서 5분 (1cycle)이었다. 내부표준 유전자인 18s PCR 조건은 94°C에서 4분 (1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초 (21 cycles), 72°C에서 5분 (1 cycle)이었다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide 첨가한 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동한 후 자외선 광으로 유전자 발현정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 ImageJ (NIH, USA) 소프트웨어에 의해 정량하였다.

Table 1. PCR primer sequences

Gene	Primer	Sequence ¹⁾
GK	Forward	GCT CAC TCA GGA CTT TGA TGC
	Reverse	AGC CAC TCA GTG ATG GTA TGG
PDH	Forward	AAT CCA ACT GGT TAC TTT TGA AGA
	Reverse	AAG AGC TGA GCA GCT GTG TAA
ACC	Forward	CTC CTG CTC ATC ACA GTA TG
	Reverse	GCA AGG CTA CTA AGG CAG G
18S	Forward	GAG CCT GAG AAA CGG CTA C
	Reverse	CCC ATT ATT CCT AGC TGC G

1) Primers are shown 5 → 3

통계분석

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS (statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA) 프로그램을 이용하여 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 각 농도 평균차는 one-way ANOVA 분석을 실시하였으며, p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결 과

세포독성

6종 한약재 물 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 HepG2 세포에 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000 ppm 농도 범위에서 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 대조구와 비교했을 때 산수유 (CO), 목단피 (PSA), 산약 (DJ), 숙지황 (RG), 지골피 (LC), 야생배 (PP) 물 추출물 모두 250, 500 ppm 농도에서는 90% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내었다. 그러나 목단피와 지골피는 고농도인 1,000, 2,500 ppm에서 대조구와 비교했을 때 55% 이하 생존율로 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 세포내 GCK, PDH, ACC mRNA 발현량을 측정하기 위한 각 추출물의 농도를 세포 생존율에 영향을 주지 않는 500 ppm 농도 범위에서 진행하였다.

Glucokinase mRNA 발현

HepG2 세포에 한약재 물 추출물을 처리한 후 GCK mRNA 발현 정도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 각 소재들의 물 추출물을 100, 250, 500 ppm 농도로 처리하였을 때 산수유 (CO), 목단피 (PSA), 산약 (DJ), 야생배 (PP)의 GCK mRNA 발현량은 농도 의존적으로 증가되었다. 저농도인 100 ppm에서는 숙지황 (RG) 물 추출물의 GCK mRNA 발현량이 165%로 가장 높게 나타났고 (p < 0.001), 야생배 (PP)는 92%로 가장 낮은 수준을 보였다. 250 ppm에서는 숙지황 (RG)과 지골피 (LC) 물 추출물에서 각각 180%, 154%로 높았으며, 500 ppm에서는 산수유 (CO, 195%) > 목단피 (PSA, 157%) > 야생배 (PP, 139%) > 산약 (DJ, 122%) > 지골피 (LC, 117%) > 숙지황 (RG, 113%) 순으로 GCK mRNA 발현이 증가되었다. 결과적으로 세포내 GCK mRNA 발현량을 증가시킬 수 있는 소재로 산수유, 목단피, 숙지황 등을 꼽을 수 있겠다.

Pyruvate dehydrogenase mRNA 발현

한약재 물 추출물의 PDH mRNA 발현 정도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 각 소재들을 대조구와 비교했을 때 100 ppm에서는 거의 활성을 나타내지 않았지만, 250 ppm에서는 지골피 (LC, 141%)와 숙지황 (RG, 118%) 물 추출물의 PDH mRNA 발현량이 증가되었고, 500 ppm에서는 지골피 (LC, 190%), 숙

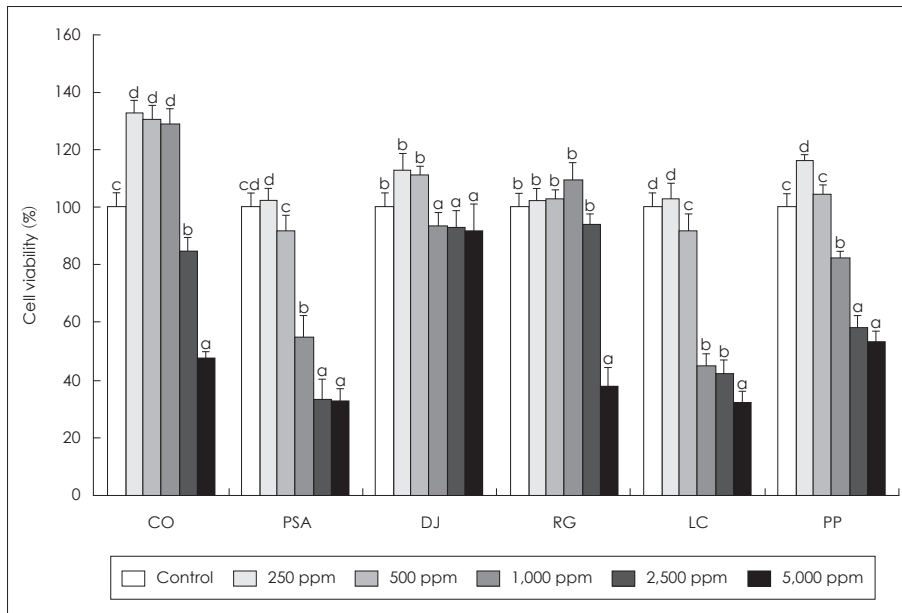


Fig. 1. Effect of medicinal herb water extracts on the cell viability in HepG2 cells. Results are from three experiments and expressed as Mean \pm SE (n = 3). Means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05). CO: *Cornus officinalis*, PSA: *Paeonia suffruticosa* Andrews, DJ: *Discorea japonica* Thunb, RG: *Rehmannia glutinosa*, LC: *Lycium chinense*, PP: *Pyrus pyrifolia*.

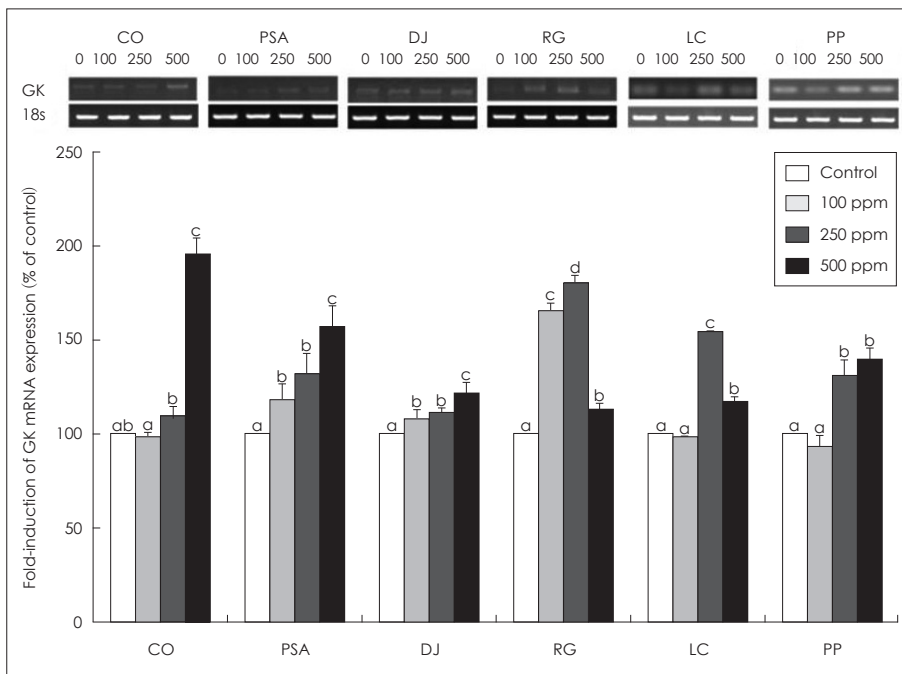


Fig. 2. Glucokinase mRNA expression of the water extracts from medicinal herbs. Results are from three experiments and expressed as Mean \pm SE (n = 3). Means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05). CO: *Cornus officinalis*, PSA: *Paeonia suffruticosa* Andrews, DJ: *Discorea japonica* Thunb, RG: *Rehmannia glutinosa*, LC: *Lycium chinense*, PP: *Pyrus pyrifolia*.

지황 (RG, 123%), 산약 (DJ, 112%) 물 추출물의 발현량이 높게 나타났다. 한편 산수유 (CO), 목단피 (PSA), 야생배 (PP) 물 추출물은 농도가 증가할수록 PDH 활성을 점차적으로 감소시켰고 500 ppm에서는 대조구보다 낮은 수준의 활성을 보였다. 따라서 PDH mRNA 발현량을 효과적으로 높일 수 있는 소재는 지골피와 숙지황으로 사료된다.

Acetyl-CoA carboxylase mRNA 발현

HepG2 세포에 다양한 농도 (100, 250, 500 ppm)로 한약재

물 추출물을 처리한 후 ACC mRNA 발현 정도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 500 ppm 농도로 처리하였을 때 지골피 (LC, 333%), 숙지황 (RG, 127%), 산약 (DJ, 115%) 순으로 ACC mRNA 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 250 ppm 농도에서는 지골피 (LC)와 숙지황 (RG) 물 추출물로 처리했을 때 각각 188%, 120%로 나타났다. 그러나 100 ppm 농도에서는 ACC mRNA 발현량이 대조구 보다 약간 낮거나 유사한 수준을 나타내었다. 이상의 결과에서 세포내 ACC 효소의 활성을 가장 높일 수 있는 소재는 지골피로 나타났다.

Fig. 3. Pyruvate dehydrogenase mRNA expression of the water extracts from medicinal herbs. Results are from three experiments and expressed as Mean \pm SE (n = 3). Means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05). CO: *Comus officinalis*, PSA: *Paeonia suffruticosa* Andrews, DJ: *Discocorea japonica* Thunb, RG: *Rehmannia glutinosa*, LC: *Lycium chinense*, PP: *Pyrus pyrifolia*.

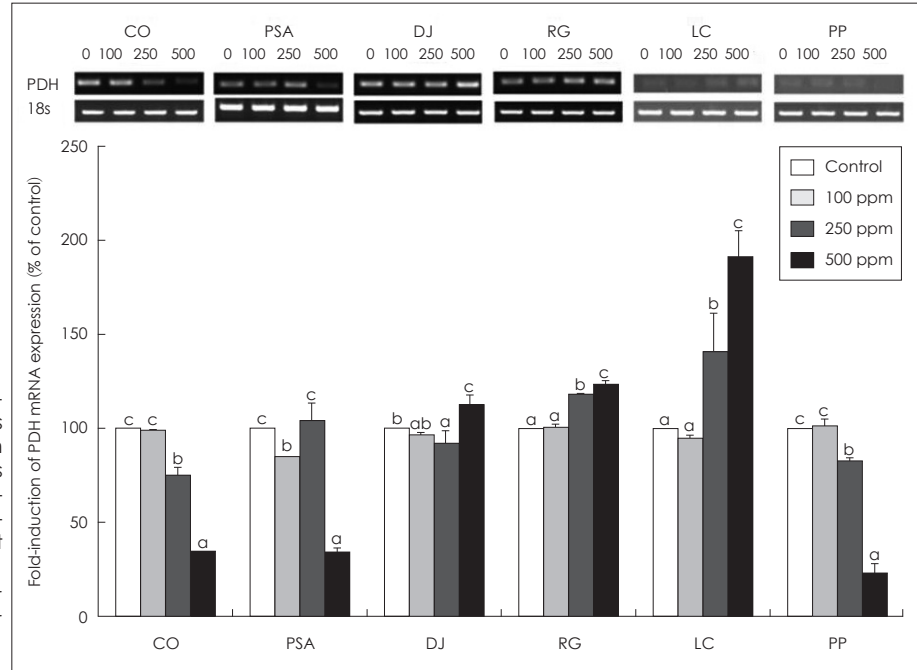
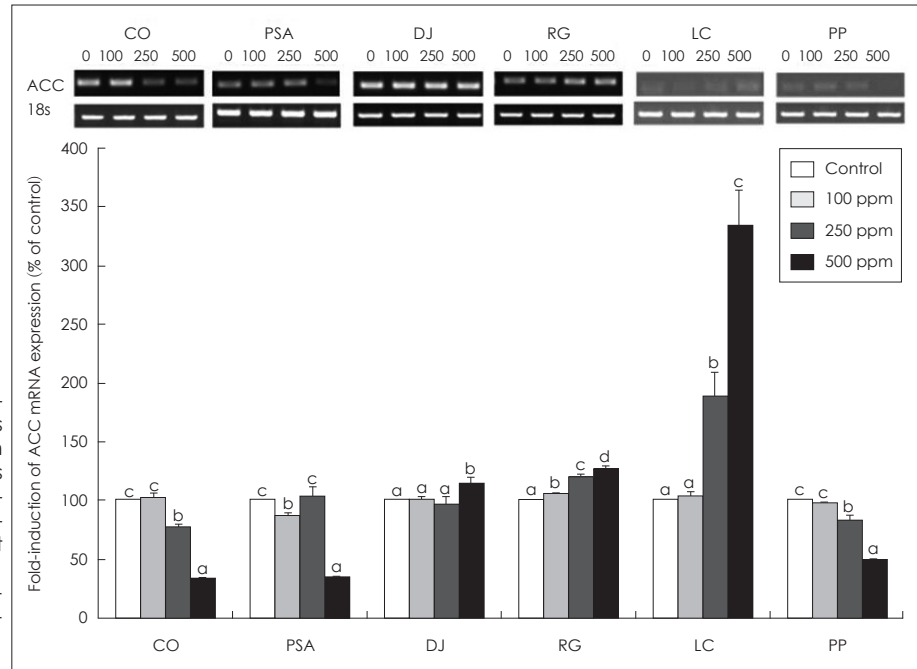


Fig. 4. Acetyl-CoA carboxylase mRNA expression of the water extracts from medicinal herbs. Results are from three experiments and expressed as Mean \pm SE (n = 3). Means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05). CO: *Comus officinalis*, PSA: *Paeonia suffruticosa* Andrews, DJ: *Discocorea japonica* Thunb, RG: *Rehmannia glutinosa*, LC: *Lycium chinense*, PP: *Pyrus pyrifolia*.



고찰

당뇨병은 췌장의 β -cell 기능저하로 인해 당 대사와 관련된 효소의 활성을 정상적으로 유도하지 못하는 질환으로, 에너지 원으로 사용되어야 하는 당이 세포 속으로 충분히 흡수되지 못하므로 당의 이용률이 낮아져 혈당치가 높아지는 질병이다. 본 연구에서는 산수유, 목단피, 산약, 숙지황, 지골피, 야생배

물 추출물이 당대사 관련 효소인 GCK, PDH, ACC mRNA 발현정도에 미치는 영향을 검토하였다. HepG2 세포는 일반 hepatocyte의 기능을 모두 가지고 있고 증식률이 빠르기 때문에 대사 관련 연구에서 매우 선호하는 세포이다. 최근 HepG2 세포를 이용하여 대사성 증후군인 당뇨, 비만을 연구하는 보고들이 늘고 있다. Nakamaru 등²⁹⁾은 당뇨치료제 AICAR을 HepG2 세포에 처리한 후 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성이 증가되었다고 보고하였고, Choi 등³⁰⁾은 잔대 추출

물을 HepG2 세포에 처리하여 항비만, 항고지혈증 효과가 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 HepG2 세포를 이용하여 6 종 한약재의 항당뇨 기능성을 과학적으로 입증하였다.

당뇨병에 걸리게 되면 GCK 활성이 현저히 감소되고 GCK-knockout은 혈당상승을 유발하는 것으로 알려져 있다.³¹⁻³³⁾ 따라서 GCK 활성을 증가시키는 것은 당뇨병 치료에 매우 중요한 것이며, 본 연구에서는 산수유, 목단피, 숙지황 물 추출물에서 GCK mRNA 발현량이 현저히 증가되었다. 당뇨병과 GCK의 활성에 대한 연구에서 Pari와 Rajarajeswari³⁴⁾는 2형 당뇨 유발 흰쥐에게 cumarin을 섭취시켰을 때 hexokinase 효소의 활성이 약 1.2배 증가되었다고 보고하였고, Jung 등³⁵⁾은 hesperidin과 naringin이 GCK 활성을 유의적으로 증가시켰고 GCK 증가는 혈당감소로 이어졌다고 보고하였다. Kondeti 등³⁶⁾은 자단껍질이 당뇨유발 흰쥐에서는 GCK 효소의 활성을 증가시켰고, fructose-1,6-bisphosphatase 효소의 활성은 감소시켰다고 하였다. Ko 등³⁷⁾은 Min6 세포에서 길경 분획물이 GCK mRNA 발현을 증가시켰다고 하여 본 연구와 유사한 경향이었으며, 이는 베타세포의 기능을 향상시켜 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 향상시켰기 때문이라 보고하였다. Kang 등³⁸⁾은 당뇨유발 흰쥐의 GCK 활성 및 GCK mRNA 발현은 정상쥐에 비하여 낮았지만 인슐린 투여 후 증가되었으며, 인슐린은 GCK 효소의 합성을 증가시키는 것으로 보고하였다. 이러한 관점에서 본 연구에서 사용된 산수유, 목단피, 숙지황 물 추출물의 GCK mRNA 발현 증가는 당뇨증상을 개선해 줄 수 있는 천연소재로 활용될 수 있음을 시사해 주고 있다.

간의 PDH 및 ACC 활성은 당뇨에 걸려 있을 때는 낮아지고 혈당의 원인이 된다.^{38,39)} 결과적으로 이들 효소들의 활성 증가가 당뇨를 개선해 줄 것으로 사료된다. 본 연구에서는 지골피, 숙지황 물 추출물이 PDH mRNA 발현을 증가시켰으며, 지골피 물 추출물은 ACC mRNA 발현을 증가시켰다. 당대사 관련 효소에 대한 연구에서 Lee 등⁴⁰⁾과 Kim 등⁴¹⁾은 홍삼 사포닌 성분과 동충하초 분획물이 ACC와 PDH를 활성화시켜 당뇨를 개선시킬 수 있다고 보고하였고, Choe 등⁴²⁾은 백복령, 목단피는 PDH 활성을 증가시켰으며 택사는 ACC 활성을 증가시켰다고 하였다. 항당뇨 약제인 Triglitazone은 ACC 활성을 증가시켰다는 보고하였으며,⁴³⁾ Kim 등⁴⁴⁾은 지골피 물 추출물 10 mg/mL 처리에 의해 ACC 활성이 160.8% 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서 지골피 물 추출물의 ACC mRNA 발현은 0.5 mg/mL 농도에서 대조군과 비교하여 333% 증가되었으며, 이는 지골피 물 추출물이 당뇨개선을 위한 항당뇨 소재로서의 가능성을 제시하고 있다.

결론적으로 본 연구에 사용된 한약재 가운데 산수유, 숙지황 및 지골피 물 추출물은 당뇨로 인해 활성이 낮아진 GCK,

PDH, ACC mRNA 발현을 가장 뛰어나게 증가시킴으로서 흡수된 당의 이용과 지방산 합성에 보다 유리하게 작용하여 혈당의 급격한 상승을 억제시킬 수 있을 것으로 판단된다. 추후 선발된 소재의 배합비를 결정하여 연구를 진행한다면 더 높은 수준의 항당뇨 소재 개발에 활용될 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 산수유, 목단피, 산약, 숙지황, 지골피, 야생배의 한약재 물 추출물이 당대사 관련 효소인 GCK, PDH, ACC mRNA 발현정도에 미치는 영향을 측정하였다. HepG2 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, GCK, PDH, ACC mRNA 발현량을 측정하기 위한 물 추출물의 농도 범위는 세포 생존율에 영향을 주지 않는 100, 250, 500 ppm로 결정하였다. GCK mRNA 발현은 100 ppm에서 숙지황 물 추출물이 165%로 가장 높게 나타났고, 250 ppm에서는 숙지황과 지골피 물 추출물이 각각 180%, 154%로 높았으며, 500 ppm에서는 산수유 (195%), 목단피 (157%), 야생배 (139%), 산약 (122%), 지골피 (117%), 숙지황 (113%)의 순으로 GCK mRNA 발현이 증가되었다. PDH mRNA 발현량은 250 ppm 농도에서 지골피, 숙지황 물 추출물에서 각각 141%, 118% 증가되었고, 500 ppm에서는 지골피, 숙지황 물 추출물에서 각각 191%, 124% 증가되었다. ACC mRNA 발현량은 500 ppm에서 지골피 (188%), 숙지황 (126%)로 가장 높게 나타났다. 결과적으로 GCK, PDH, ACC mRNA 발현량을 증가시킬 수 있는 소재로 산수유, 숙지황, 지골피 등을 꼽을 수 있겠으며 이들 소재들은 식후 혈당상승을 억제할 수 있는 항당뇨 천연소재로 이용될 수 있음을 제시하였다.

Literature cited

- 1) Egede LE, Ellis C. Diabetes and depression: global perspectives. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87(3): 302-312
- 2) Joo CN, Koo JH, Lee HB. Study on the hypoglycemic action of the fat soluble fraction of *Panax ginseng* C.A. meyer in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Ginseng Sci* 1993; 17(1): 13-21
- 3) Joo CN, Kim SJ. Hypoglycemic action of the fat soluble fraction of *Panax ginseng* C.A. meyer in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Ginseng Sci* 1993; 17(2): 101-108
- 4) Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effect of *Lycii fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Pharmacogn* 2009; 40(2): 128-136
- 5) Park MJ, Kang SJ, Kim AJ. Hypoglycemic effect of *Angelica gigas* Naki extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Nutr* 2009; 22(2): 246-251
- 6) Takeda Y, Inoue H, Honjo K, Tanioka H, Daikuhara Y. Dietary response of various key enzymes related to glucose metabolism in normal and diabetic rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1967; 136(2): 214-222

- 7) Huang TH, Yang Q, Harada M, Uberai J, Radford J, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. Salacia oblonga root improves cardiac lipid metabolism in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac PPAR- α -mediated transcription of fatty acid metabolic genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 210(1-2): 78-85
- 8) Kang SY, Paeng JR, Seo KS, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW, Kim YS, Kim KW, Choi YK. Regulation of glucokinase gene expression and activity in the liver of diabetic rats. *Korean J Med* 1994; 47(2): 203-209
- 9) Lee EB, Choi BC, Cho TS. Pharmacological studies on ether fraction of Corni fructus. *Yakhak Hoeji* 1985; 29(1): 1-10
- 10) Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effects of Corni fructus in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oil Chem Soc* 2005; 22(2): 157-167
- 11) Joo HK, Jang DJ. Effects of Shanshuyu (Cornus officinalis Sieb) tea and market teas feeding on the hematology and liver function of rat. *Korean J Diet Cult* 1989; 4(3): 257-264
- 12) Seo KI, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and antioxidative activities of Corni fructus extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol* 1999; 6(1): 99-103
- 13) Fukuhara Y, Yoshida D. Paeonol: a bio-antimutagen isolated from a crude drug, Moutan cortex. *Agric Biol Chem* 1987; 51(5): 1441-1442
- 14) Mitsuo M, Maruyama H, Kameoka H. Essential oil constituents of "Moutan radicis cortex" Paeonia Moutan Sims. (P. suffruticosa Andrews). *Agric Biol Chem* 1983; 47(12): 2925-2927
- 15) You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe M. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of Paeonia suffruticosa water extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(3): 292-296
- 16) Park S, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ, Choi SB. Hypoglycemic effects of crude extracts of Moutan radicis cortex. *Korean J Food Sci Technol* 2004; 36(3): 472-477
- 17) Lee ST, Chae YH. Botany of herbal resource. Seoul: Hakmun Publishing Co.; 1996. p.130
- 18) Jeong HJ, Kim IH. Comparative studies on the antidiabetic activities of Rehmanniae radices -the effect of Rehmanniae radices extracts on streptozotocin-induced hyperglycemia in rats-. *Chung-Ang J Pharm Sci* 1990; 4: 22-31
- 19) Cho YJ. Characterization of biological activities of Rehmannia glutinosa extracts. *J Life Sci* 2012; 22(7): 943-949
- 20) Cho SI. Effects of the Rehmanniae radix preparat on ovariectomized rats. *Korean J Herbol* 2005; 20(4): 61-67
- 21) Sheo HJ, Jun SJ, Lee MY. Effects of Lycii fructus extract on experimentally induced liver damage and alloxan diabetes in rabbits. *J Korean Soc Food Nutr* 1986; 15(2): 136-143
- 22) Kim BW, Roh KS. Study on the activity of GOT and GPT in the hepatotoxic rat treated Lycium chinense mill. *Korean J Biomed Lab Sci* 2000; 6(3): 187-192
- 23) Yoon CG, Kim HH, Chae SN, Oh MJ, Lee GH. Hepatic oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats fed diets supplemented with Lycium chinense ethanol extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001; 30(4): 668-672
- 24) Ahn BY, Gwak JS, Ryu SH, Moon GS, Choi DS, Park SH, Han JH. Protective effect of water extract of Lycii cortex radicis on lipid peroxidation of rat skin exposed to ultraviolet B radiation. *Agric Chem Biotechnol* 2002; 45(4): 218-222
- 25) Yu TJ. The food guide. Seoul: Munundang; 1989. p.166
- 26) Choi HJ, Park JH, Han HS, Son JH, Son GM, Bae JH, Choi C. Effect of polyphenol compound from Korean pear (Pyrus pyrifolia Nakai) on lipid metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33(2): 299-304
- 27) An BJ, Lee JT, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH, Bae JH, Choi C. Biological activity of polyphenol group fraction from Korean pear peel. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2004; 47(1): 92-95
- 28) Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 205(3): 225-236
- 29) Nakamaru K, Matsumoto K, Taguchi T, Suefuji M, Murata Y, Igata M, Kawashima J, Kondo T, Motoshima H, Tsuruzoe K, Miyamura N, Toyonaga T, Araki E. AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(2): 449-454
- 30) Choi HJ, Kim SH, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. Effects of Adenophora triphylla ethylacetate extract on mRNA levels of antioxidant enzymes in human HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37(10): 1238-1243
- 31) Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A. Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(14): 7225-7230
- 32) Muñoz MC, Barberà A, Domínguez J, Fernández-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ. Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 2001; 50(1): 131-138
- 33) Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson MA. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 1999; 274(1): 305-315
- 34) Pari L, Rajarajeswari N. Efficacy of coumarin on hepatic key enzymes of glucose metabolism in chemical induced type 2 diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2009; 181(3): 292-296
- 35) Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(7): 1134-1145
- 36) Kondeti VK, Badri KR, Maddirala DR, Thur SK, Fatima SS, Kasetti RB, Rao CA. Effect of Pterocarpus santalinus bark, on blood glucose, serum lipids, plasma insulin and hepatic carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(5): 1281-1287
- 37) Ko BS, Kwon DY, Hong SM, Park S. In vitro anti-diabetic effects of crude extracts of Platycodi radix. *Korean J Food Sci Technol* 2007; 39(6): 701-707
- 38) Shimizu T, Parker JC, Najafi H, Matschinsky FM. Control of glucose metabolism in pancreatic β -cells by glucokinase, hexokinase, and phosphofructokinase. Model study with cell lines derived from β -cells. *Diabetes* 1988; 37(11): 1524-1530
- 39) Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39(6): 647-652
- 40) Lee HA, Sim HS, Choi KJ, Lee HB. Hypoglycemic action of red ginseng components (II): investigation of the effect of fat soluble fraction from red ginseng on enzymes related to glucose metabolism in cultured rat hepatocytes. *Korean J Ginseng Sci* 1998; 22(1): 51-59
- 41) Kim HS, Ro YJ, Choe M. Effects of Cordyceps militaris on key enzymes of carbohydrate metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005; 34(10): 1531-1535
- 42) Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH, Chung MJ. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37(5): 542-547
- 43) Thampy GK, Haas MJ, Mooradian AD. Troglitazone stimulates acetyl-CoA carboxylase activity through a post-translational mechanism. *Life Sci* 2000; 68(6): 699-708
- 44) Kim DJ, Chung MJ, You JK, Seo DJ, Kim JM, Choe M. Effect of medicinal plant water extracts on glucose-regulating enzyme activities in Goto-Kakizaki rat liver cytosol. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(10): 1331-1335