

고과당식이 랫드모델에서 적하수오 투여에 의한 대사증후군 개선효과

고민철^{1,2#}, 이윤정^{1,2}, 윤정주^{1,2}, 이호섭^{1,2}, 강대길^{1,2*}

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 한방체액조절연구센터

Beneficial effect of *Polygoni Multiflori Radix* in high fructose diet-induced metabolic syndrome rat model

Min Chul Kho^{1,2#}, Yun Jung Lee^{1,2}, Jung Joo Yoon^{1,2}, Ho Sub Lee^{1,2}, Dae Gill Kang^{1,2*}

1 : College of Oriental Medicine, 2 : Hanbang Body-fluid research center, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : *Polygoni Multiflori Radix* (Jeokhasuo in Korean) is a Oriental traditional herbs widely used in East Asian countries. Overconsumption of fructose results in hypertension, dyslipidemia, obesity and impaired glucose tolerance which have documented as a risk of cardiovascular diseases. This experimental study was designed to investigate the beneficial effects of an ethanol extract from *Polygoni Multiflori Radix* (PMR) in high-fructose (HF) diet-induced metabolic syndrome rat model.

Methods : Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups; Control group, receiving regular diet and tap water, HF group, and HF + PMR group both receiving supplemented with 65% fructose (n=10), respectively. The HF + PMR group initially received HF diet with PMR (100 mg/kg/day) for 8 weeks.

Results : PMR significantly prevented the metabolic disturbances such as hyperlipidemia, hypertension and impaired glucose tolerance. Chronic treatment with PMR significantly decreased body weight, fat weight and adipocyte size, suggesting a role of anti-obesity effect. PMR led to improve the hyperlipidemia through the increase in HDL cholesterol level as well as the decrease in triglyceride and LDL cholesterol level. In addition, PMR suppressed adhesion molecules and endothelin-1 (ET-1) expression in aorta resulting in the decrease of hypertension. In muscle tissue, PMR significantly recovered the HF-induced insulin resistance through increase of insulin receptor substrate-1 (IRS-1), p-AMPK α 1/2, and p-Akt expression. PMR improved HF-induced metabolic disorders and its action was caused by energy metabolism-mediated insulin signaling activation.

Conclusions : These results demonstrate that PMR may be a beneficial therapeutic for metabolic syndrome through the improvement of hyperlipidemia, obesity, insulin resistance and hypertension.

Key words : *Polygoni Multiflori Radix*; Metabolic syndrome; Obesity; Hyperlipidemia; Hypertension

서론

식생활의 서구화로 인한 과다 영양섭취로 비만 인구의 증가와 함께 고혈압, 심혈관질환, 동맥경화증 등의 심혈관계 질환과 인슐린 저항성으로 인한 당뇨병과 같이 여러 가지 질환을 동반하는 환자수가 급증하고 있는데, NCEP-ATPⅢ (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel

Ⅲ)에서는 이러한 현상을 대사증후군 (Metabolic syndrome) 이라 규정하고 있다¹⁾. 대사증후군의 발생기전은 보통 과도한 에너지 섭취에 인하여 필요 이상 과도하게 축적되는 지방조직과 그로 인한 비만과 상관성이 있다고 보고 있다. 그로인해 정상적인 생리, 생화학적 기능에 영향을 미쳐 염증질환의 주된 원인으로 작용하게 되고, 혈중 중성지방과 LDL-cholesterol의 증가, HDL-cholesterol의 농도 감소 그리고 혈관 내피손

*Corresponding author : Dae Gill Kang, College of Oriental Medicine Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6933 · FAX : +82-63-850-7260 · E-mail : dgkang@wku.ac.kr

#First author : Min Chul Kho, College of Oriental Medicine Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6447 · FAX : +82-63-850-7260 · E-mail : shadowzetx@hanmail.net
· Received : 25 February 2015 · Revised : 20 March 2015 · Accepted : 20 March 2015

상 등으로 인하여 고혈압, 고지혈증과 같은 심혈관 질환을 유발하게 된다²⁾. 또한 대사증후군은 인슐린 저항성이 자리하고 있어 이것은 근육, 지방조직 그리고 간 조직 등에서 포도당 대사와 더불어 인슐린 호르몬의 신호전달 체계의 장애로 인하여 유발되며, 이것은 제2형 당뇨병을 제외하고도 많은 수에서 당뇨병 이전에 인슐린 저항성을 보이는 사람이 많으며, 이것 역시 심혈관질환 및 뇌졸중 발생에 중요한 인자로서 잘 알려져 있다³⁾. 혈관 내피세포의 손상은 세포 부착 분자 (cell adhesion molecules)와 같은 분자와 혈관수축인자인 endothelin-1 (ET-1)과 같은 분자들을 발현 증가를 유도하여 혈관 내피 세포 기능 저하 및 조직손상을 불러와 혈관염증 및 고혈압을 유발하게 된다⁴⁾.

최근에는 이러한 대사성 질환은 치료보다 예방이 필요한 질환으로 여겨져, 고지혈증, 고혈압, 그리고 당뇨병 등을 예방하고 저해하는 각종 생리활성 물질을 천연물로부터 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 치료효과에 대한 관심이 높아져 이에 대한 수요도 증가하고 있다⁵⁻⁷⁾.

적하수오 (Polygoni Multiflori Radix, PMR)는 다년생 덩굴성 초본으로 마디풀과의 식물에 속한다. 예로부터 간(肝), 신(腎)을 보익하고 혈을 자양하며 풍(風)을 제거하는 효능이 있다고 알려져 있어서 정력 감퇴, 부인과 질병 및 현훈 등을 치료하는데 이용되어 왔다⁸⁾. 적하수오에는 anthraquinone 화합물인 chrysophanol, emodin, rhein physcion 및 이들의 배당체인 2,3,5,4'-tetra-hydroxystibene 2-O-β-D-glucopyranoside 및 2-O-mongalloyl ester 등과 같이 생리활성 물질이 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 적하수오는 각종 항산화 효과, 항염증 효과, 최종당화산물 (AGEs)의 생성 차단 그리고 신경보호 효과 등 다양한 생리 활성에 대한 효능이 알려져 있다¹⁰⁻¹³⁾.

이와 같이 적하수오의 각종 생리 활성에 관한 연구 결과에서 각종 효능이 입증되었음에도 불구하고 만성적인 대사성 질환에 대한 효능연구는 미비하다. 따라서 본 연구는 고과당 식이를 실시한 랫드에서 유발되는 고혈압, 고지혈증, 비만 그리고 인슐린 저항성 등과 같은 대사성 질환을 적하수오의 투여로 인한 개선 효과를 검토하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 적하수오 추출물의 제조

적하수오 (PMR)는 전북 무주에서 생산-재배된 것을 구입하여 사용하였다. 건조되어 있는 상태의 400 g의 적하수오를 분쇄한 후 삼각 플라스크에 4L의 95% 에탄올을 넣고 상온상태에서 일주일 동안 추출하였다. 추출물을 Whatman No.3 filter paper (Whatman International Ltd, England)을 이용하여 여과한 후, 적하수오 추출물을 농축한 후 냉동건조기를 이용하여 동결 건조시켜 수율 약 4.98%의 양을 획득한 후 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다 (Voucher specimen: HBI141).

2. 실험동물 및 식이

모든 실험은 대학 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻어 시

행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. Sprague-Dawley (SD) 랫드 7 주령 수컷 30마리를 신타코 (오산, 한국)에서 구입하여 온도 23 ± 2℃, 습도 50~60%의 상태로 유지되는 항온-항습 장치에서 12시간씩 암기와 명기가 자동으로 조성되는 환경에서 사육하였다. 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 후, 다음과 같이 총 3개의 군으로 각각 10마리씩 나누어서 사용하였다: 1) Control (regular diet), 2) HF (65% high fructose diet), 3) HF + PMR (HF + 100 mg/kg/day of PMR). Control 그룹은 8주 동안 regular diet (50% starch, 21% protein, 4% fat and standard vitamins and mineral mix)를 먹었으며, HF 그룹은 Research Diet (Research Diet, USA)사의 65% high fructose diet (65% fructose, 20% protein, 10% fat and standard vitamins and mineral mix)를 구입하여 8주 동안 투여하였다. 그리고 HF + PMR 그룹은 HF와 함께 적하수오 100 mg/kg/day의 농도로 증류수에 녹여서 경구투여 하였다.

3. 혈압의 측정

Automatic sphygmotography (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)를 이용하여 랫드의 수축기 평균혈압을 꼬리 동맥에서 측정하였다. 각 개체마다 최소 8번의 혈압을 측정하고 그 중 5mmHg 내에 있는 5번의 측정값을 평균값으로 이용하였다.

4. 경구내당능검사 (Oral glucose tolerance test)

경구내당능검사는 PMR 투여 후 8주에 실시하였다. 12시간 동안 공복상태를 유지한 후에 포도당 용액을 2 g/kg의 농도로 경구투여한 후에 매 30분 동안 혈당의 변화를 측정하였다. 꼬리 정맥에서 얻은 혈액으로 혈당을 측정하였으며, Onetouch-Ultra Blood glucose Meter 및 Test Strip (Life Scan Inc., CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 콜레스테롤 및 지질 함량 측정

랫트를 희생시켜 얻은 혈장을 3,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하고 수집하였으며, 공복 시 혈장 내 콜레스테롤 및 지질 함량을 측정하였다. Total cholesterol (T-Chol), triglyceride (TG), low-density lipoproteins cholesterol (LDL-c), high-density lipoproteins cholesterol (HDL-c)의 혈액생화학적 수치를 각각 Hitachi 7080 (Hitachi, Japan)과 HDL and LDL/VLDL Assay kit (E2HL-100, BioAssay Systems)를 이용하여 분석하였다.

6. 부고환 지방조직 무게 측정 및 부고환 지방조직 세포의 크기 측정

랫트를 희생시킨 후 복부를 절개하여 부고환 지방 조직을 적출하여 생리식염수를 이용하여 혈액 및 이물질을 제거하여 무게를 측정하였다. 계속해서 부고환 지방조직의 세포의 크기를 측정하고자, 무게를 측정한 후 지방조직을 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4℃에서 8시간 고정하고, 30% sucrose 용액에

조직을 침적시켰다. 조직을 O.C.T. compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance)에 넣고 영하 30°C에서 동결한 후 cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA) 를 이용하여 30 μ m의 두께로 평행하게 횡단절편을 만든 후 poly-L-lysine 으로 코팅한 슬라이드에 부착시켰다. 충분히 건조시킨 다음 H-E (hematoxylin-eosin) 염색을 거쳐 봉입제로 봉합 한 후 광학현미경으로 Axiovision 4 Imaging/ Archiving software (Axiovision 4, Carl Zeiss, Germany) 을 사용하여 400배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

7. 혈관조직 절편 제작과 혈관 조직의 조직면역염색

랫드에서 흉부대동맥 조직을 수집하여 10% 포르말린에 3일 동안 고정시킨 후, 수세를 통해 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 60% 에탄올에서부터 100% 에탄올까지 농도 상승 순으로 탈수과정을 거친 후, xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후에 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기 (microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 5 μ m으로 자른 후 슬라이드 위에 부착 시켜 실온에서 건조하였다.

파라핀 블록을 이용하여 제작한 혈관 조직에 관하여 조직면역염색을 진행하였다. 조직면역염색은 HISOTO-STAIN®-SP kits (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 Labeled-[strept] Avidin-Biotin (LAB-SA) 방법을 이용하여 진행하였다. 탈파라핀, 함수화의 과정을 거친 후, 내인성 과산화효소의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 10분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 PBS로 세척한 다음, 10% non-immune goat serum을 사용하여 10분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 그런 다음 VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin (Santa Cruz, CA, USA)의 primary 항체를 각각 1:200의 농도로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이후 biotinylated secondary 항체로 20분간 실온에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB; Novex®, CA) chromogen과 hematoxylin (Zymed, CA, USA)를 이용하여 일정시간 동안 발색시킨 다음 세척한 후 봉입제로 봉입하였다. 각각의 발현 정도는 광학현미경으로 Axiovision 4 Imaging/Archiving software (Axiovision 4, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 400배 시야에서 사진을 촬영하고, Image J (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 정량화하여 수치화하였다.

8. 혈관과 근육의 Western blot 분석

랫드를 희생시킨 후 흉부대동맥 조직과 후지근육 (hindlimb muscle) 조직을 수집하여, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 그리고 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6) 로 조성된 Homogenase buffer로 용해시켜 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford (Bio-Bad, USA) 법으로 정량하여 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 로 전기영동하여 분리하였다. 전기영동 후에 gel내에 있는 단백질을 nitrocellulose membranes로 전이시켜 5% BSA powder가 포함된 0,05%

Tween 20-Tris-buffered saline (TBS) 용액에 1시간 동안 비특이성 결합을 방지하기 위하여 blocking을 시행하였다. Blocking 과정을 거친 후, Santa Cruz (CA, USA)에서 구입한 primary 항체 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin 그리고 ET-1 (in aorta), AMPK, p-AMPK, Akt, p-Akt 그리고 IRS-1 를 각각 1:1000의 농도로 TBS 용액에 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 그 후 TBS에 1:5000의 농도로 horseradish peroxidase-conjugated secondary 항체를 1시간 동안 실온에서 반응시키고, 충분한 세척 과정을 거쳐 enhanced chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 발현을 측정하고, Chemi-doc image analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량 및 분석하였다.

9. 통계처리

실험 결과의 유의성은 Systat의 SigmaPlot version 10.0 을 사용하여 Student's *t*-test나 one-way ANOVA test를 통하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다. 몸무게, 부고환지방의 무게와 크기, 혈압 및 혈액학적 지표들의 차이와 변화율의 표현은 일반식이군을 100 %로 기준으로 삼았을 때, 고과당 식이군 그리고 고과당+적하수오 투여 군에서의 변화를 %로 전환하여 결과를 도출하였다.

결 과

1. 체중 및 부고환 지방조직 무게의 변화

8주동안 일반 식이와 고과당 식이를 실시하여 적하수오 추출 물이 체중에 미치는 영향을 비교하였다. 실험 시작시의 체중에서는 각 군 간의 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 실험 완료시의 체중에서는 일반식이 군에 비교하여 고과당 식이 군에서 5.68%정도 유의성 있게 체중이 현저하게 증가하였지만, 고과당 + 적하수오 투여 군에서 체중이 8.51%정도 유의성 있게 감소하는 결과를 나타내었다($p < 0.05$, Table 1). 또한 총 실험기간 동안 체중 증가량은 고과당 + 적하수오 투여 군에서 고과당 식이 군에 비해 유의성 있게 감소한 결과를 보였다.

부고환 지방조직 무게를 측정된 결과, 일반식이 군에 비교하여 고과당 식이 군에서 47.40% 정도 유의성 있게 증가하였으나, 고과당 + 적하수오 투여 군에서는 고과당 식이 군에 비해 45.49% 정도 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

Table. 1. Effect of an PMR on body weight and epididymal fat pads.

Groups	Control	HF	HF+PMR
Initial BW (g)	245.4 ± 2.1	246.7 ± 3.7	246.9 ± 2.9
Terminal BW (g)	434.8 ± 4.4	459.4 ± 10.7 [*]	422.5 ± 8.4 [#]
Gain BW (g)	189.4 ± 3.7	208.7 ± 7.2 [*]	172.6 ± 7.4 ^{##}
Epididymal fat pads weight (g)	2.5 ± 0.2	4.1 ± 0.5 ^{**}	2.7 ± 0.3 [#]

Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). ^{*} $p < 0.05$ vs. Cont.; [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ vs. HF.

Abbreviations: HF, high fructose ; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of *Polygoni Multiflori Radix* BW, body weight.

2. 혈장 내 콜레스테롤 및 지질 대사에 미치는 영향

혈장 내 지질 함량 분석 결과, 고과당 식이 군에서 총콜레스테롤 (T-Cho) 함량이 일반식이 군에 비해 51.70% 정도 유의성 있게 증가하였으나, 적하수오 투여로 인해 45.31% 정도 유의성 있게 감소하는 결과를 보였다(Table 2). 중성지방 (TG) 그리고 저밀도 콜레스테롤 (LDL-c)의 수치 역시 고과당 식이 군에서 일반식이 군에 비해 각각 325.25%, 57.08% 정도 유의성 있게 증가하였으나, 적하수오 투여로 인해 각각 165.21%, 69.49% 정도 유의성 있게 감소되는 결과를 나타내었다. 고밀도 콜레스테롤 (HDL-c)은 고과당 식이 군에서 일반식이 군과 유의성 있는 변화가 보이지 않았으나 적하수오 투여 군에서는 유의성 있는 증가효과를 보였다 ($p < 0.05$).

Table 2. Effect of treatment PMR on plasma lipids.

Groups	Control	HF	HF+PMR
T-Cho (mg/dl)	70.29 ± 3.8	109.52 ± 7.6 **	72.19 ± 3.7 #
TG (mg/dl)	81.20 ± 7.5	291.40 ± 48.3 **	134.17 ± 22.1 #
HDL-c (mg/dl)	14.25 ± 1.0	14.40 ± 1.0	20.0 ± 1.3 #
LDL-c (mg/dl)	27.76 ± 2.1	46.98 ± 3.5 **	24.29 ± 1.9 ##

Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). ** $p < 0.01$ vs. Cont.; # $p < 0.05$ vs. HF, ## $p < 0.01$. Abbreviations: HF, high fructose ; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix T-Cho, total cholesterol ; TG, triglyceride ; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol ; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol.

3. 혈압 변화

적하수오가 혈압의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 랫드의 꼬리 동맥에서 수축기 평균혈압을 측정하였다. 그 결과 고과당 식이를 실시한 수축기 평균혈압은 7주째에 일반 식이를 실시한 군에 비해 31.76% 정도 유의적으로 증가하였으나, 고과당 + 적하수오 투여 군에서 20.08% 정도 유의성 있게 감소하는 결과를 보였다($p < 0.01$, Fig. 1).

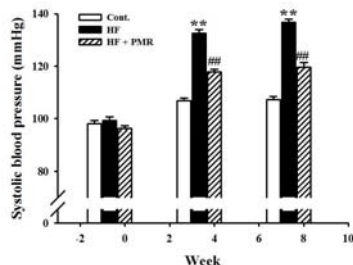


Fig. 1. Effect of an PMR on systolic blood pressure (SBP) in fructose-diet rats. Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). ** $p < 0.01$ vs. Cont.; ## $p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont., control ; HF, high fructose ; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix.

4. 경구 내당능검사의 변화

8주간 고과당 식이를 통한 랫드에서 적하수오 투여에 의한

내당능 개선효과를 알아보기 위하여 경구 내당능검사를 진행하였다. 30분 간격을 두고 혈당을 측정한 결과, 고과당 식이를 실시한 군에서의 혈당수치는 일반식이 군에 비해 유의성 있게 증가한 결과를 보였다. 하지만 적하수오를 투여한 군에서의 혈당수치는 30분과 90분에서 각각 고과당 식이군과 비교하여 유의성 있게 감소하는 결과를 보였다(Table 3).

Table 3. Effect of treatment PMR on oral glucose tolerance test.

Groups	Control	HF	HF+PMR
0 min (mg/dl)	98.5 ± 4.6	100.2 ± 3.7	104.5 ± 1.7
30 min(mg/dl)	139.8 ± 5.7	170.4 ± 3.9 **	158.8 ± 6.8 #
60 min (mg/dl)	127.0 ± 2.7	141.4 ± 3.9 *	137.4 ± 4.1
90 min(mg/dl)	103.2 ± 4.1	122.4 ± 5.5 *	106.0 ± 2.9 #
120 min(mg/dl)	89.4 ± 2.2	107.3 ± 2.3 *	102.6 ± 4.9

Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Cont.; # $p < 0.05$ vs. HF. Abbreviations: HF, high fructose ; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix.

5. 혈관 염증 마커 및 혈관수축 인자에 대한 발현 변화

8주간 고과당 식이를 통한 랫드에서 적하수오 투여에 의한 혈관 염증 마커인 adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin)의 발현변화를 확인하기 위하여 immunohistochemistry 와 wetern blotting 을 각각 실시하였다. 그 결과, 고과당 식이를 실시한 군은 일반식이를 실시한 군에 비해 흉부대동맥 adhesion molecules 의 발현이 확연히 증가하였지만, 적하수오 투여로 인하여 증가되었던 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-3).

또한 혈관수축에 있어 중요조절 인자 중의 하나인 endothelin-1 (ET-1)의 변화를 알아보하고자 wetern blotting를 진행하였다. 그 결과, 고과당 식이를 실시한 군은 일반식이를 실시한 군에 비해 ET-1 발현이 확연히 증가하였지만, 적하수오를 투여로 인하여 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

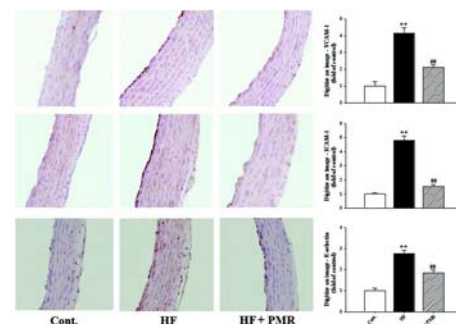


Fig. 2. Effects of PMR on VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin immunoreactivity in thoracic aortic tissues of HF diet rats. Representative Immunohistochemistry and each quantifications are shown (magnification x400). Values were expressed as mean ± S.E. ** $p < 0.01$ vs. Cont.; ## $p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont., control ; HF, high fructose ; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix.

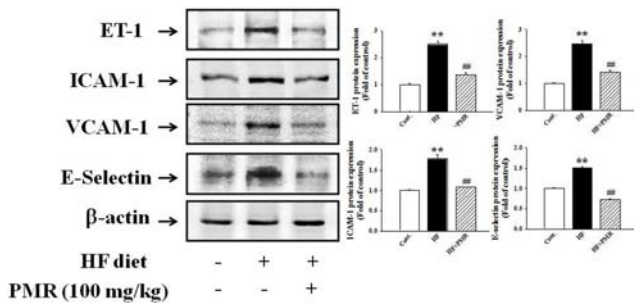


Fig. 3. Effects of PMR on the expression of ET-1 and adhesion molecules in thoracic aortic tissues of HF diet rats. Representative each quantifications are shown. Each electrophoretogram is representative of the results from three individual experiments. Values were expressed as mean \pm S.E. $^{**}p < 0.01$ vs. Cont.; $^{##}p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont., control; HF, high fructose; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix.

6. 근육조직에서 인슐린 신호전달 및 에너지대사 경로 인자에 대한 발현변화

내당능검사를 통하여 인슐린 신호전달에 및 에너지대사 경로 인자에 대한 적하수오의 효능을 알아보기 위하여, 랫드를 희생하여 얻은 근육조직에서 단백질을 분리 및 추출하여 western blotting 을 진행하였다. 그 결과, 인슐린 신호전달에 있어 중요한 시그널인 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)의 발현이 고과당식이를 실시한 군에서 일반식이 군보다 현저하게 감소 된 것을 볼 수 있었으나, 적하수오를 투여함에 따라 감소되었던 IRS-1/Akt의 발현이 회복되는 결과를 볼 수 있었다.

또한, 에너지대사경로에 있어서 중요한 인자인 AMPK의 활성화의 발현여부를 진행한 결과, 고과당식이를 실시한 군에서의 AMPK 인자의 활성화가 일반식이 군보다 현저하게 감소된 결과를 볼 수 있었다. 하지만 적하수오를 투여한 군에서는 감소되었던 발현이 회복되는 결과를 볼 수 있었다(Fig. 4).

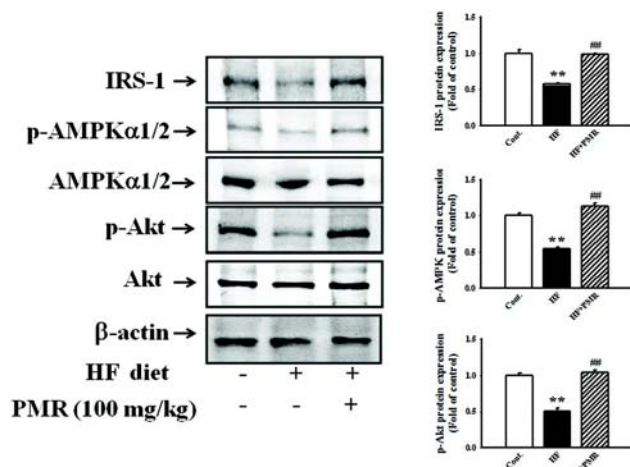


Fig. 4. Effects of PMR on the expression of IRS-1, p-AMPK, AMPK, p-Akt and Akt in the skeletal muscle of HF diet rats. Representative each quantifications are shown. Each electrophoretogram is representative of the results from three individual experiments. Values were expressed as mean \pm S.E. $^{**}p < 0.01$ vs. Cont.; $^{##}p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont., control; HF, high fructose; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix.

6. 부고환 지방세포의 크기변화

부고환 지방세포의 크기변화를 관찰하기 위하여 지방조직의 Hematoxylin & Eosin (H-E) staining을 실시하여 Axiovision 4 Imaging/Archiving software 로 측정 및 분석하였다. 그 결과, 고과당 식이를 실시한 군에서 일반식이 군과 비교하여 지방세포의 크기가 40.97% 정도 증가하였으나, 적하수오를 투여함에 따라 증가되었던 지방세포의 크기가 20.88% 정도 감소되는 결과를 보였다(Fig. 5).

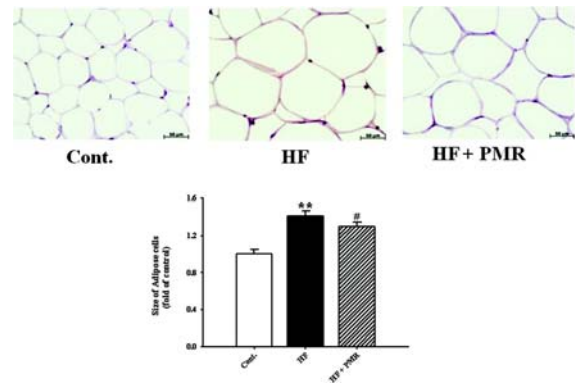


Fig. 5. Representative microscopic photographs of H&E stained section of the epididymal fat pads in HF diet rats. Lower panel indicated size of adipose cells (magnification x400). Scale bar=50 μ m. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=5). $^{*}p < 0.01$ vs. Cont.; $^{#}p < 0.05$ vs. HF. Abbreviations: Cont., control; HF, high fructose; HF+PMR high fructose diet with ethanol extract of Polygoni Multiflori Radix.

고찰

본 연구는 고과당식이에 의해 유도된 대사증후군에서 적하수오 추출물이 어떠한 개선효과를 나타내는지 검증하기 위하여 진행되었다. NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)의 기준에 따르면 복부비만, 고혈압, 고혈당, 고중성지방혈증, 저고밀도지단백혈증 등의 5가지 심혈관계질환 위험인자 중 3가지 이상을 가지고 있으면 대사증후군으로 진단한다¹⁾. 대사증후군이 위험인자이면서 중요한 것은 그 자체가 질병이기도 하지만 심혈관 및 뇌혈관질환 등과 밀접하게 관련되어 있기 때문이다. 제 2형 당뇨병 환자에서 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증, 특히 고중성지방혈증과 고콜레스테롤혈증으로 나타나며, 이러한 고지혈증은 죽상경화증의 주요 위험인자의 하나로 작용하여 결과적으로 심혈관계 합병증과 비만, 그리고 인슐린 저항성 등의 발생에 영향을 미친다^{14,15)}. Klop 등에 의하면 식이중의 지방산 조성이 혈중 지방함량에 큰 영향을 미치는데, 혈중 총콜레스테롤과 중성지방의 농도상승은 동맥경화를 유발시키는 요인으로 보고하였으며, 심혈관 질환 환자의 지질 성분인 저밀도 콜레스테롤의 감소는 고밀도 콜레스테롤의 증가로 이어져 지질대사를 개선시킬 수 있다고 하였다^{16,17)}. 본 연구에서 고과당식이군에서 보여진 고지혈증은 중성지방의 증가, 총콜레스테롤의 증가 그리고 저밀도 콜레스테롤의 증가로 나타났다. 적하수오 추출물을 투여하였을 때 중성지방, 총콜레스테롤 그리고 저밀도 콜레스테롤 함량은 유의적으로 감소

하였으며, 고밀도 콜레스테롤 함량은 유의적으로 증가하였다. 그러므로 적하수 추출물은 고지혈증의 질환을 개선시킬 수 있다고 보여진다.

식이성 과당의 과량 섭취는 비만이나 대사증후군의 임상증상을 발달시키는데 가장 적절하며, 실제로 가장 잘 알려진 대사증후군의 실험모델로서 고과당식이 또는 비만형 당뇨병 모델인 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 랫드 등이 있다^{18,19}. 고지방식이는 지방세포의 비대와 비만을 유도하여, 만성적으로 내당능 장애와 더불어 인슐린 저항성과 같은 대사성 장애를 일으키게 되어, 제 2형 당뇨병과 관련되어 있다고 알려져 있다^{20,21}. 적하수 추출물을 8주간 투여한 후의 체중 증가는 고과당식이군에 비하여 유의성있게 감소하였다. 복부지방을 직접적으로 확인하지는 않았으나 부고환 지방 무게 역시 유의적으로 감소시켰으며, 지방세포 역시 감소시킴으로써 적하수 추출물에 의한 항비만효과를 확인할 수 있었다.

인슐린은 시상하부에서 의해서 조절되는 호르몬으로서, 인슐린 신호전달이 향상될 때 인슐린 저항성을 개선시키고 지방세포의 비대를 억제하는 것으로 알려져 있다. 근육내 IRS-1가 활성화 되면 phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase)가 활성화되고 이 PI-3 kinase에 의하여 serine/threonine kinase 인 Akt/PKB (protein kinase B)가 활성화되면 인슐린의 표적세포에서 인슐린의 세포 내 작용이 일어나게 된다²². AMP-activated protein kinase (AMPK)는 serine/threonine kinase의 일종으로 세포 내 에너지 (ATP)가 결핍될 때 활성화되어 세포 내 에너지 생산을 증가시키는 효소로서 AMPK 시그널은 혈당과 지방산을 근육에서 제어하고 조절하여 제 2형 당뇨병을 치료 및 예방에 잠재적인 타겟 단백질로 알려져 있다²³. 본 실험에서는 인슐린 수용체 기질 (IRS-1) 과 Akt의 발현은 고과당 식이군에 의해 감소되었으나, 적하수 투여에 의해서 증가됨을 보였다. 또한 고과당 식이군은 일반식이 군과 비교했을 때 AMPK 활성의 지표인 AMPK 인산화가 유의하게 감소하였다. 그러나, 적하수를 투여한 군에서는 AMPK 인산화를 유도하는 것으로 보여졌다.

한편 인슐린 호르몬은 혈관내피세포에서 PI3K 에 의해 매개된 세포 내 신호전달체계를 통하여 nitric oxide (NO)를 생성함으로써 혈관확장 효과를 나타내고, mitogen-activated protein kinase (MAPK)를 경유하는 세포 내 신호전달체계를 통해 강력한 혈관 수축 물질인 endothelin-1 (ET-1)을 생성하여 혈관수축작용을 나타낸다^{24,25}. 생리적 상태에서는 이 두 가지 신호전달체계가 적절하게 균형을 이루고 있지만, 인슐린 신호전달체계의 장애로 인한 내당능 장애, 고인슐린혈증 및 인슐린 저항성 등의 증상으로 인하여 ET-1의 발현을 증가시켜 고혈압을 유도하게 된다²⁶. 본 실험에서는 고과당 식이에 의한 ET-1의 발현 및 이에 따른 고혈압이 유도되었으나, 적하수를 투여함에 따라 증가되었던 ET-1과 혈압을 감소시키는 결과를 보였다. 그러므로 적하수에 의한 혈압강하 효과의 결과는 인슐린 신호전달경로를 활성화시켜 인슐린 저항성을 개선하는 효과와 연관성이 있는 것으로 보여진다.

지방의 대사가 고혈당, 고인슐린혈증 그리고 고지질혈증 등의 의해 적절하게 이루어지지 않게 되면 비만과 더불어 산화성 스트레스가 증가하게 되는데, 이것은 염증성 사이토카인인 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), MCP-1

(monocyte chemoattractant protein-1), IL-6 등을 증가시키고, 반대 작용을 하는 adiponectin 분비를 감소시켜 atherosclerosis의 발병원인이 된다²⁷. 죽상경화의 초기 단계에서 내피세포에서는 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 과 같은 세포 유착분자의 발현이 증가하게 되는데, 이것은 단핵구 및 백혈구 등이 염증부위로 침투를 증가하게 되어, 염증 사이토카인의 분비와 함께 혈관염증을 더욱 진행시킨다. 염증 반응의 지속으로 인해 거품 세포의 숫자가 증가하면서 일부가 괴사하게 되고 죽은 세포들이 머금고 있던 지질이 배출되면서 평활근 세포의 증식과 더불어 fibrous cap을 형성하고 죽상경화반 (atherosclerotic plaque)을 형성하게 된다^{28,29}. 본 실험에서는 흉부대동맥 내 adhesion molecules의 발현을 알아보기 위해 western blot과 Immunohistochemistry을 진행한 결과, 고과당 식이로 인하여 증가되었던 발현이 적하수 추출물의 투여로 인하여 감소함을 알 수 있었다. 고과당으로 유도된 대사증후군 모델에서는 중증의 죽상경화 병변은 나타나지 않았지만, 적하수오는 혈관 부착인자의 발현을 억제시켜 염증을 억제함으로써 초기단계의 항-죽상경화 효과를 나타낸다고 보여진다. 그러나 대사증후군에 대한 양성대조군이 현재까지 밝혀져 있지 않기 때문에 양성대조군의 비교실험을 수행하지 않은 것이 본 실험의 한계점이라 보인다. 또한 고과당식을 실시 한 후 적하수를 투여한 것이 아니기 때문에 치료효과보다는 예방적인 측면이 강하다고 보이며, 그러므로 후속연구로 양성대조군을 포함하여 적하수에 대한 대사증후군 치료효능에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 고과당식으로 유도된 대사증후군 동물모델에서 적하수 에탄올 추출물의 유의한 효과에 대하여 관찰하고자 수행하였다.

1. 고과당식을 실시한 대사증후군 랫드 모델에서 적하수 추출물을 8주간 투여하였을 때, 체중 및 부고환 조직의 무게 감소와 지방조직의 크기 감소를 보여주었다.
2. 적하수 투여군은 총콜레스테롤, 중성지방 및 LDL 저밀도 콜레스테롤 함량을 감소시키고, 고밀도 콜레스테롤 함량을 증가시켰다.
3. 적하수 투여군은 혈관 내피에서 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 혈관유착인자와 ET-1의 발현을 억제시켜 혈관기능부전을 개선시킴으로써 항-고혈압 효과와 초기 항-죽상경화 효과를 보여주었다.
4. 적하수 투여군은 인슐린 신호전달 체계와 세포내 에너지 신호전달 체계를 활성화 시켜 인슐린 저항성을 개선시켜 항-당뇨의 효과를 보여주었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 대사증후군 모델에서 적하수 투여군은 지방세포의 크기를 감소시켜 항-비만 효과를 보여주었으며, 콜레스테롤 수치를 정상화 시켰다. 또한 혈관 유

착분자 및 혈관 수축인자의 발현을 감소시켜 혈압강하효과를 보여주었다. 적하수오 투여군은 에너지 대사를 매개로 한 인슐린 신호전달경로를 활성화시켜 인슐린 저항성을 개선시킴으로써 고지혈증, 고혈압, 비만, 당뇨병 뿐만 아니라 광범위한 대사의 기능 부전의 예방 및 치료에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

감사의 글

본 연구는 대학 연구비지원(2013)에 의해 수행되었음.

References

- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. National Cholesterol Education Program: Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA*, 2001 ; 285(19) : 2486-97.
- Sharma AM. Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002 ; Suppl 4 : S5-7.
- Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabete Obes*, 2011 ; 18(2) : 139-43.
- Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 ; 282(1) : E207-14.
- Yotsumoto H, Yanagita T, Yamamoto K, Ogawa Y, Cha JY, Mori Y. Inhibitory effect of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: Evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med*, 1997 ; 63(2) : 141-5.
- Miettinen TA. Cholesterol absorption inhibition: A strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int J Clin Pract*, 2001 ; 55(10) : 710-6.
- Shin MK, Han SH. Effects of methanol extracts from bamboo(*Pseudosasa japonica* Makino) leaves extracts on lipid metabolism in rats fed high fat and high cholesterol diet. *Korean J Food Culture*, 2002 ; 17(1) : 30-6.
- Wang W, Cao CY, Wang DQ, Zhao DZ. Effect of prepared polygonum multiflorum on striatum extracellular acetylcholine and choline in rat of intracerebral perfusion with sodium azide. *zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2006 ; 31(9) : 751-3.
- Na MK, Park JY, An RB, Lee SM, Kim YH, Lee JP, Seong RS, Lee KS, Bae KH. Quality evaluation of Polygoni multiflori Radix. *J Pharmacogn*, 2000 ; 31(3) : 335-9.
- Lv L, Gu X, Tang J, Ho C. Antioxidant activity of stillbene glycoside from polygonum multiflorum thunb in vivo. *Food Chem*, 2007 ; 104 : 1678-81.
- Chang CH, Lin CC, Yang JJ, Namba T, Hattori M. Anti-inflammatory effect of emodin from Ventilago leiocarpa. *Am J Chin Med*, 1996 ; 24(2) : 139-42.
- Lv L, Shao X, Wang L, Huang D, Ho CT, Sang S. Stilben glucoside from polygonum multiflorum thunb.: a novel natural inhibitor of advanced glycation end product formation by trapping of methylglyoxal. *J Agric Food Chem*, 2010 ; 58(4) : 2239-45.
- Qin R, Li X, Tao L, Li Y, Sun J, Kang X, Chen J. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against neurotoxicity induced by MPP+: the involvement of PI3K/Akt pathway activation. *Toxicol Lett*, 2011 ; 202(1) : 1-7.
- Son HY. Lipid metabolism in diabetes mellitus. *J Korea Diabetes Assoc*, 1985 ; 9(2) : 159-64.
- Fredric LD. Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diab Metab Rev*, 1990 ; 6 : 47-61.
- Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 2013 ; 5(4) : 1218-40.
- Potter SM, Bakhit RM, Essexorlie DL, Weingarther KE, Chapman KM, Nelson RA, Prabhudesai M, Savage WD, Nelson AI, Winter LW. Depression of plasma cholesterol in men by consumption of baked products containing soy protein. *Am J Clin Nutr*, 1993 ; 58(4) : 501-6.
- Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*, 1983 ; 72(3) : 1150-62.
- Hajnal A, Covasa M, Bello NT. Altered taste sensitivity in obese, prediabetic OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005 ; 289(6) : R1675-86.
- Lee YS, Cha BY, Yamaguchi K, Choi SS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. Effects of Korean white ginseng extracts on obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Cytotechnology*, 2010 ; 62(4) : 367-76.
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Ferguson K, Thompson PA, Holloszy JO. High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000 ; 279(6) : R2057-65.
- Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse model into disease

- mechanisms. *J Endocrinol*, 2014 ; 220(2) : T1–T23.
23. Misra P. AMP-activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control. *Expert Opin Ther Targets*, 2008 ; 12(1) : 91–100.
24. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*, 2007 ; 28(5) : 463–91.
25. Reaven GM. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr*, 2005 ; 25 : 391–406.
26. Piatti PM, Monti, LD, Conti M, Baruffaldi L, Galli L, Phan CV, Guazzini B, Pontiroli AE, Pozza G. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes*, 1996 ; 45(3) : 316–21.
27. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2004 ; 114(12) : 1752–61.
28. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007 ; 5(2) : 265–82.
29. Li G, Sanders JM, Phan ET, Ley K, Sarembock IJ. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*, 2005 ; 167(6) : 1511–8.