



Original Article / 원저

황칠, 닥나무, 꾸지뽕 혼합 추출물의 항당뇨 효과

김솔¹, 김상준¹, 오준석², 홍재희², 김선영^{1*}

¹(재)전주농생명소재연구원, ²동부생약영농조합법인

Antidiabetic Effects of Mixed Extract from *Dendropanax morbiferus*, *Broussonetia kazinoki*, and *Cudrania tricuspidata*

Sol Kim¹, Sang-Jun Kim¹, Junseok Oh², Jae-Heoi Hong², Seon-Young Kim^{1*}

¹Jeonju AgroBio-Materials Institute,

²Dongbu Eastern Herbal Medicine Agricultural Association Corporation

ABSTRACT

Dendropanax morbiferus (D), *Broussonetia kazinoki* (B), and *Cudrania tricuspidata* (E), a widely cultivated species in South Korea, has been used as traditional medicine to treat numerous diseases. In this study, we evaluated the antidiabetic effects in a various signaling mechanisms using mixed extract and major component contents were analyzed by HPLC in the combined extracts from *Dendropanax morbiferus*, *Broussonetia kazinoki*, and *Cudrania tricuspidata* (DBCE). DBCE inhibited α -glucosidase and α -amylase activation and showed potent antioxidant effects, which are evaluated using DPPH, ABTS, and SOD assay. Cytokines, which are released by inflammatory cells in pancreatic islets, are involved in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. DBCE showed the protective effects in RINm5F cells against cytokines-induced damage by suppressing inducible nitric oxide (NO) synthase and COX-2 expression and NO production. Insulin resistance is the primary characteristic of type 2 diabetes. Therefore, the regulatory effect of DBCE on glucose uptake and production are investigated in insulin-responsive human HepG2 cells. DBCE stimulated glucose uptake, prevented Glut2 and phosphor-IRS1 downregulation induced by high glucose (HG, 30 mM). Moreover, DBCE pretreatment diminished glucose levels, PEPCK and G6Pase overexpression provoked by HG. These findings suggest that DBCE might be used for diabetes treatment through alpha-glucosidase or

© 2019 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

alpha-amylase activity regulation, pancreatic beta cell protection, hepatic glucose sensitivity improvement. Cytokines, which are released by inflammatory cells' infiltrations around the pancreatic islets, are involved in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus.

Key words : Antidiabetic effects, *Broussonetia kazinoki*, *Cudrania tricuspidata*, *Dendropanax morbiferus*, hyperglycemia.

I. 서론

당뇨병은 대사성 질환 중 하나로 인슐린 분비 감소, 인슐린 내성 혹은 이들 두 가지 요인이 복합적으로 작용하여 혈당이 증가하는 질병이다¹⁾. 당뇨병은 신장, 심장을 포함한 다양한 장기에 합병증을 유발하며 궁극적으로 삶의 질을 저하시킨다¹⁻²⁾. 당뇨는 제 1형과 제 2형으로 나누며 90% 이상의 당뇨가 제 2형 당뇨이다³⁾. 제 1형 당뇨는 자가 면역반응에 의해 췌장 베타 세포가 손상됨에 따라 인슐린 분비를 못함으로 혈당이 상승한다. 제 1형 당뇨의 발병원인이 명확히 밝혀지지 않았으나 현재까지는 유전적, 환경적 요인에 의한 것으로 알려져 있다⁴⁾. 제 2형 당뇨는 소아나 청소년에 비해 성인에서 많이 발병하고 과도한 탄수화물 및 당 섭취와 운동부족에 의한 체중증가 및 비만과 매우 밀접한 관계가 있다⁵⁾. 최근 연구에 따르면 제 2형 당뇨 환자의 췌장에서 제 1형 당뇨와 유사하게 면역세포 침착과 이로 인한 염증 매개 인자인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon (IFN)- γ , interleukin-1 β (IL-1 β)이 분비되며, inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현이 증가됨으로 nitric oxide (NO)를 과도하게 형성하여 췌장 β -세포를 파괴시킨다고 보고되었다⁶⁻⁷⁾. 이러한 배경에서 췌장 베타 세포의 손실을 억제하기 위해 IL-1 수용체 억제제 등을 적용하기도 하였으나 세포내 활성산소 생성유발 효소의 과발현, 부작용, 독성 등의 문제로 인해 천연 소재에 대한 수요가 증가하고 있다⁸⁾.

인슐린 저항성(insulin resistance)은 제 2형 당뇨에서 주요한 병태생리적 요인 중 하나로 인슐린 민감도 저하, 포도당 흡수 감소, 포도당 신생 증가가 주요한 특징이다. 간 조직은 신체의 에너지 대사 조절

에 관여하는 중요한 기관이며, 지속적인 혈당 증가를 유발하는 병태생리적 기전에서 간 조직 내 포도당 대사 조절이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹⁰⁾.

황칠(*Dendropanax morbiferus* Lev.)은 두릅나무과에 속하는 한국의 특산종으로 난대림대 및 온대인 서남부 해안지역과 도서지역에 제한적으로 자생한다. 황칠나무 추출물이 streptozotocin에 의해 유도된 당뇨 동물 모델에서 혈당개선 효능이 보고되었다¹¹⁾. 닥나무(*Broussonetia kazinoki*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽활엽관목으로 한국, 대만, 일본 등에 널리 자생하고 있다. 닥나무 추출물과 기능 성분에 의해 insulin sensitivity 개선, 췌장 베타세포 보호 기전을 통한 혈당 개선 효능이 다수 보고되었다¹²⁻¹⁴⁾. 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)은 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 한국, 일본, 중국 등지에 주로 분포하고 있다. 최근 꾸지뽕 잎 추출물의 비만과 혈당 개선에 효능이 보고된 바 있다¹⁴⁻¹⁵⁾.

본 연구는 황칠, 닥나무, 꾸지뽕 복합 추출물의 탄수화물 분해효소 억제, RINm5F cells에서 cytokines에 의한 세포 보호기전, HepG2 cells에서 포도당 대사 조절 기전 등을 분석하여 혈당개선을 위한 소재로의 이용 가능성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 혼합 추출물 제조

본 실험에 사용된 황칠(*Dendropanax morbiferus*, D), 닥나무(*Broussonetia kazinoki*, B), 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*, C)은 전라남도 순천시 동부생약 영농조합으로부터 제공받았다. 혼합 추출물(DBCE)을 제조하기 위해 황칠(1.2 kg), 닥나무(1.2 kg),

*Corresponding author : Seon-Young Kim, Jeonju AgroBio-Materials Institute, 111-27, Wonjangdong-gil, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabukdo, 54810, Republic of Korea.

Tel : +82-63-711-1053, Fax : +82-63-711-1051, E-mail : Seon02@jbmi.re.kr

•Received : August 4, 2019 / Revised : August 20, 2019 / Accepted : August 23, 2019

꾸지뽕(1.2 kg)을 칭량하여 70% 에탄올 36 L을 혼합한 뒤 70°C에서 8시간 동안 추출 후 55 µm 백필터로 여과하였다. 여액을 29 brix까지 농축한 뒤 55 µm 백필터로 2회 여과하였다. 여액은 분무 건조하여 분말 형태로 회수하였다(124.5 g). 회수한 추출물(DBCE)은 -20°C에서 보관하면서 사용하였다. 실험을 위해 추출물은 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여서 사용하였다.

2. HPLC에 의한 주요성분 정량분석

분석시료 조제를 위해 추출물 1 g을 70% 메탄올 수용액을 추출용매로 하여 희석한 뒤 원심분리(12,000 rpm, 15 min) 한 후 상층액을 취하여 0.2 µm PTFE syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였다. HPLC (Agilent 1200 series with MWD) 분석을 위해 컬럼은 Shiseido CapCell PAK MGII C18 (4.6×150 mm, 3 µm, Shiseido, Co., Ltd. Tokyo, Japan)을 사용하였고 시료 주입량은 15 µL, 검출 파장은 254 ~ 320 nm에서 측정하였다. 이동상은 A 용매(0.1% orthophosphoric acid in water)와 B 용매(acetonitrile)를 사용하였고, 유속은 0.45 mL/min로 하였다. 이동상의 농도구배 조건은 0 min-25% B, 4 min-25% B, 8 min-30% B, 12 min-35% B, 16 min-45% B, 19 min-45% B, 22 min-70% B, 27 min-70% B, 28 min-40% B, 30 min-25% B로 하였다.

3. 세포배양

본 연구에서는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입한 췌장 베타 세포주, RINm5F와 인체 간암세포주, HepG2를 사용하였다. 각각의 세포 배양을 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin 이 함유된 RPMI 1640 (Gibco, USA)와 DMEM (Gibco, USA) 배지를 사용하였다. 37°C, 5% CO₂ 환경에서 3 ~ 4일 간격으로 계대 배양하면서 유지시켰다.

4. 항산화 효능

항산화 효능은 Arnao¹⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH (α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여능은 시료액 20 µL와 DPPH 용액 80 µL

를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 분광광도계(Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50%로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀으로 나타내었다. Ascorbic acid를 양성대조구로 사용하였다.

ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 라디칼 소거능은 Van den Berg등의 방법¹⁷⁾을 변형하여 측정하였다. 7.4 mM ABTS 용액에 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 암소에서 약 12시간 반응시켜 생성된 ABTS^{•+}를 사용하였다. ABTS^{•+} solution 285 µL를 취하여 각 농도별 시료 15 µL를 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며 양성대조구는 Trolox[®]를 사용하였다. 라디칼 소거능은 IC₅₀으로 나타내었다.

SOD (superoxide dismutase) 유사 활성은 SOD assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 측정하였으며 결과는 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 IC₅₀을 확인하였다.

6. α-Glucosidase 및 α-Amylase 저해활성 측정

α-Glucosidase 저해활성은 1 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (*p*NPG)를 phosphate buffer (pH 6.8)에 첨가한 후 시료를 넣고 그 혼합액에 α-glucosidase (Sigma-Aldrich)를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응시키고 0.1 M NaOH를 첨가하여 반응을 종결시켜 반응 생성물인 *p*-nitrophenol을 분광광도계(Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 405 nm에서 측정하여 α-glucosidase 활성의 억제 정도를 측정하였다. 흡광도의 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. α-Amylase의 저해활성은 시료와 α-amylase 효소를 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 용액으로 반응을 정지시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 변화로부터 효소 저해 활성을 계산하였다.

$$\text{Inhibition activity (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A: 시료가 첨가된 시험구의 흡광도

B: 시료가 첨가되지 않은 대조구의 흡광도

7. 세포생존율 측정

세포생존율 측정을 위하여 96 well plate에 RINm5F 췌장 베타세포를 1.0×10^4 cells/well로 분주하고, 24시간 동안 안정화시킨 뒤 두 그룹으로 나누어 DBCE 추출물을 농도별로 첨가하여 1시간 동안 전 처리한 뒤 한쪽 그룹에는 cytokines (5 ng/mL IL-1 β 10 ng/mL TNF- α and 10 ng/mL IFN- γ)를 처리하여 48시간 배양하였다. 48 시간 뒤 각 well당 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt, Promega Co., Ltd. USA] 용액을 10 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

8. RINm5F cells에서 산화질소(nitric oxide, NO) 소거능 측정

산화질소 생성에 대한 DBCE의 효능을 분석하기 위해 RINm5F cells을 6-well plates (5×10^5 cells/well)에 분주하고, DCBE를 농도별(1, 10, 20, 40, 80, 100 μ g/mL)로 전처리한 뒤 1시간 뒤에 cytokines를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 96 well plate에 각 실험군의 배지 100 μ L와 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)를 동량으로 주입한 후 10분간 실온에서 반응시키고 540 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다. Nitrite양은 동일한 조건에서 NaNO₂ 농도를 측정한 표준곡선에서 계산하였다.

9. Insulin resistance HepG2 cells에서 glucose uptake 분석

Glucose uptake는 Liu¹⁸⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. HepG2 cells을 96-well plates (1×10^4 cells/well)에 분주하고, DBCE 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤 30 mM glucose 조건에서 24시간 추가 배양하였다. 대조구는 5.5 mM glucose 조건에서 동일하게 배양하였다. 24시간 뒤 100 nM insulin을 추가하여 10분간 반응시키고 50 μ M 2-NBDG [2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose]를 30분간 처리 후 fluorescence microplate reader (SPECTRA MAX GEMINI EM, Molecular Devices, USA)로 분석(Ex_{485nm} , Em_{528nm})하

였다.

10. HepG2 cells에서 glucose production 분석

HepG2 cells에서 glucose production 분석은 HepG2 cells을 24-well plates (1×10^5 cells/well)에 분주하고, DBCE 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤 30 mM glucose 조건에서 24시간 추가 배양하였다. 대조구는 5.5 mM glucose 조건에서 동일하게 배양하였다. 24시간 뒤 100 nM insulin을 추가하여 10분간 반응시키고 배지를 회수하여 glucose production assay kit (Abcam, UK)를 사용하여 glucose 함량을 분석하였다. 측정 결과는 whole-cell lysates의 단백질 함량 기준으로 normalization 하였다.

11. Western blot에 의한 단백질 발현의 분석

단백질 발현 분석을 위해 세포를 ice-cold RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 120 mM sodium chloride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL aprotinin)을 첨가하여 30분간 lysis시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 단백질 농도는 BCA Protein Assay Kit (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량 하였다. 50 μ g의 lysate를 8-12% SDS-PAGE로 분리하여, 이를 PVDF membrane (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에 transfer하였다. 항체와 단백질 간의 비 특이적인 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% skim milk in TBST)로 1시간 동안 blocking 후 일차 항체[anti-iNOS, anti-COX-2, anti-Glut2, anti-phospho-IRS1, anti-PEPCK, anti-G6Pase (1:2,500), anti- β -actin (1:5,000), SantaCruz Biotechnology, Inc. USA]를 TBST 용액에서 희석하여 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 이차 항체 (anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG linked with horseradish peroxidase, Cell Signaling Technology, Inc. USA)를 실온에서 2시간 동안 반응하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare Life Science, USA) 용액과 반응시킨 후 Amersham Imager 600QC (GE Healthcare, USA)으로 단백질 발현을 확인하였다.

12. 통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 SigmaPlot program (v10.0, San Jose, CA, USA)를 이용하였고, 유의성 검정은 ANOVA (one-way analysis of variance) 및 Student's t-test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 혼합 추출물의 HPLC에 의한 주요성분 정량 분석

본 실험에 사용한 황칠, 닥나무, 꾸지뽕 혼합 추출물은 동부생약영농조합에서 제공받았다. 본 추출물의 각 소재의 주요 성분으로 알려진 물질 중에서 황칠 소재의 기능 성분으로 chlorogenic acid와 rutin을 선정하였고, 닥나무 소재 기능 성분으로 chlorogenic acid와 marmesin을 선정하였다(Fig. 1A). 꾸지뽕 소재는 nicotiflorine, kaempferol 및 apigenin을 선정하였다. 추출물의 HPLC chromatogram과 각각의 지표성분을 Fig. 1B에 표시하였다. 각 지표성분의 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같았다. 각 성분의 함량은 chlorogenic acid ($28.06 \pm 1.39 \mu\text{g}/\text{mg}$), kaempferol ($13.74 \pm 1.33 \mu\text{g}/\text{mg}$), rutin ($6.44 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mg}$), apigenin ($0.28 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$), nicotiflorine ($0.16 \pm 0.00 \mu\text{g}/\text{mg}$) marmesin ($0.06 \pm 0.00 \mu\text{g}/\text{mg}$) 순으로 높게 분석되었다. Phenolic acids 및 flavonoids는 항산화와 항염증은 물론 항당뇨 효능은 다수 보고되었다. 황칠과 닥나무의 주성분 중 하나인 chlorogenic acid는 다양한 소재에 함유되어 있는 성분으로 glucose와 lipid metabolism을 조절을 통하여 혈당조절에 관여하는 것으로 보고되었다¹⁹⁾. 꾸지뽕 소재의 주요 성분으로 선정한 kaempferol은 혈당조절 이외에 다양한 기능이 보고되었으며 혈당 조절과 관련한 기전은 α -glucosidase 활성 억제²⁰⁾, 췌장 베타 세포 보호, glucose metabolism 조절²¹⁾ 등에 효능이 있음이 밝혀졌다.

2. DBCE의 항산화 효과

고혈당은 다양한 신호전달 경로를 통해 ROS (reactive oxygen species) 생성을 증가시키고 이로 인해 산화적 스트레스가 증가한다. 당뇨병 환자와 당

뇨병 동물 모델의 혈액에서 superoxide dismutase, catalase, glutathione 등이 감소한다고 보고되어 있다²²⁾. 이러한 배경에 의해 DBCE의 항산화 활성을 분석하였다. 항산화 활성을 평가하는 방법으로 여러 가지가 존재하나 모든 라디칼의 생성원인이나 복잡한 생물계에서의 항산화 활성을 설명할 수 없기 때문에 본 연구에서는 라디칼 소거능을 DPPH, ABTS, SOD activity를 이용하여 확인하였다(Table 2). DPPH 라디칼을 50% 저하시키는 IC₅₀을 측정한 결과 DBCE는 $0.016 \pm 0.006 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 소거 효능을 나타냈다. DBCE가 양성대조구인 ascorbic acid의 IC₅₀인 $0.032 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 효과적인 것으로 확인되었다. ABTS radical은 $0.0792 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50% 소거능을 나타내었다. ABTS radical 소거 활성은 Trolox[®]를 양성 대조구로 사용하였으며 Trolox[®]의 IC₅₀은 $0.010 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. DBCE의 SOD유사활성은 $0.092 \pm 0.003 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 효능이 확인되었다.

3. DBCE의 탄수화물 분해 효소 활성 억제 효과

DBCE의 탄수화물 분해효소 저해활성은 α -glucosidase와 α -amylase을 대상으로 분석하였다. α -Glucosidase와 α -amylase는 탄수화물 소화와 관여하는 중요한 효소로서 섭취된 다당류는 α -amylase에 의해서 이당류로 분해되고, 분해된 이당류는 α -glucosidase에 의해 단당류로 분해되어 흡수된다. 이들 효소에 의한 탄수화물의 흡수는 식후 혈당을 급격하게 상승시킨다. 이들 효소의 억제제는 탄수화물 소화와 포도당의 흡수를 억제하므로 당뇨 치료제 개발을 위한 주요한 타겟이다²³⁾. 현재 많은 저해제들이 의약품으로 개발되었으나 위장 관련 부작용으로 인해 대체 자원이 지속적으로 요구된다. DBCE의 α -glucosidase와 α -amylase 활성 저해 효과를 측정한 결과는 Table 3에 나타낸 바와 같다. 농도별로 저해 활성을 측정한 후 50% 저해 농도를 환산한 결과 α -glucosidase, $0.016 \pm 0.010 \text{ mg}/\text{mL}$ 와 α -amylase, $0.079 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며 α -glucosidase는 acarbose의 $1.398 \pm 0.329 \mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 우수한 활성을 보였다. α -Glucosidase 저해 활성에 대한 효과가 α -amylase 저해활성 보다 우수한 것으로 확인되었다. 탄수화물 분해효소 저해 활성 대한 효능을 복합 추출물인 DBCE와 단일 추출물인 황칠 추출물

(*Dendropanax morbiferus*, DE), 닥나무 추출물 (*Broussonetia kazinoki*, BE), 꾸지뽕 추출물 (*Cudrania tricuspidata*, CE)과 비교하였을 때 각 추출물 처리 농도 0.1 mg/mL에서 α -glucosidase 활성 억제 효능은 48.72 ± 0.40 , 50.53 ± 1.45 , 48.69 ± 2.29 , $47.93 \pm 1.66\%$ 로 분석되었고, α -amylase 활성 억제 효능은 각각 16.57 ± 0.91 , 19.49 ± 1.15 , 17.76 ± 2.26 , $17.26 \pm 1.65\%$ 로 확인되었다. 복합 추출물은 단독 추출물과 유사한 탄수화물 분해 효소 활성 억제 효능을 보였으며 통계적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

4. DBCE의 RINm5F 세포에서 cytokines에 의한 세포독성 억제 효과

당뇨병에 의한 췌장 베타세포의 손상은 염증성 cytokines인 IL-1 β TNF- α INF- γ 에 의해 유발된다. DBCE를 단독으로 처리한 군의 세포생존율은 500 μ g/mL의 농도까지 대조구에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않아 시료 자체의 독성은 없는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). DBCE의 췌장 베타세포 보호능을 평가하기 위해 DBCE를 RINm5F 세포에 농도별로 전처리 한 뒤 cytokines를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 세포생존율은 MTS assay를 이용하여 측정함으로써 세포생존율에 미치는 DBCE의 효능을 판단하였다. 그 결과 cytokines를 처리한 군에서는 세포 생존율이 아무것도 처리하지 않은 대조구에 비해서 33.9% 수준으로 감소하였고 DBCE를 전처리한 결과 20 μ g/mL 이상의 농도에서 cytokines 단독으로 처리한 군에 비해 유의하게 세포 생존율의 감소가 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). DBCE의 췌장 베타세포의 염증성 cytokines에 의한 세포 생존율 감소에 대한 효과를 단일 추출물과 비교한 결과 복합 추출물인 DBCE가 각 단일 추출물에 비해 우수한 효능을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 이러한 결과를 바탕으로 복합 추출물의 항당뇨 효능 기전을 추가적으로 분석하였다.

5. DBCE의 RINm5F 세포에서 cytokines에 의한 산화질소 합성 및 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

Cytokines에 의한 췌장 베타세포의 염증기전은 세포 내 iNOS, COX-2의 과발현에 의해 세포 내 NO의

생성을 증가시킨다²⁴). NO는 췌장 베타세포 내 미토콘드리아 대사 이상과 단백질 변이를 유도하여 세포 독성을 유발하는 것으로 알려졌다²⁵). DBCE의 cytokines에 의한 NO 생성 조절 효능을 평가하기 위해 RINm5F 세포에 DBCE를 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 cytokines를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 먼저 수용액에서 안정된 상태로 존재하는 nitrite levels를 Griess reaction을 활용하여 측정하였고 NO를 발생시키는 유전자로 알려진 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 관찰하기 위하여 western blot을 시행하였다. 대조구에 비하여 cytokines를 처리한 군의 NO생성량과 iNOS와 COX-2 단백질 양은 유의하게 증가하였으나 DBCE를 전처리하였을 때 40 μ g/mL 이상에서 농도 의존적으로 cytokines에 의한 NO 생성과 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3).

6. DBCE의 insulin resistance HepG2 세포에서 glucose uptake와 production에 미치는 영향

간 조직은 gluconeogenesis와 glycogenolysis에 의해 혈액 내 혈당 조절에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만 high glucose (HG) 의한 간 세포에서의 insulin resistance는 insulin signaling의 이상을 유도하고 간 조직 내 glucose 흡수를 저하시킨다²⁶). HepG2 cells은 glucose 대사 기전이 정상 간세포와 유사²⁷) 하여 glucose metabolism과 insulin resistance에서 DBCE의 효능 분석을 위해 사용하였다. HepG2 cells에 DBCE를 HG (30 mM)에서 24시간 처리 후 insulin (100 nM)에 의한 glucose uptake를 비교하였다. Fig. 4A에서 나타난 바와 같이 low glucose (LG, 5.5 mM) 보다 HG 조건에서 insulin에 의한 glucose uptake 수준이 유의하게 감소하였고, DBCE에 의해 농도 의존적으로 glucose uptake의 증가를 확인할 수 있었다. 또한 세포 내 glucose 농도 조절에 관여하는 transporter인 Glut2 protein expression과 insulin signaling에 관여하는 IRS-1의 phosphorylation이 DBCE에 의해 증가되었다(Fig. 4B). Insulin resistance 상태의 간세포에서는 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)와 glucose-6-phosphate (G6Pase)가 활성화되어 gluconeogenesis를 촉진시킨다¹⁰). HepG2 cells에 DBCE는 농도 의존적으로 glucose의 production을

감소시켰고 PEPCK와 G6Pase의 overexpression을 억제하였다(Fig. 5). Metformin (Met)은 양성대조구로 사용하였으며 DBCE가 Met와 유사하거나 보다 우수한 효능을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 DBCE는 HG에 의한 인슐린 저항성을 조절하여 혈당 증가를 억제하는 것이라고 추측할 수 있다.

IV 결론

상기의 결과를 종합하여 황칠, 닥나무, 꾸지뽕 복합 추출물은 탄수화물 분해효소인 α -glucosidase, α -amylase 활성을 억제하고, cytokines에 의한 세포 생존율을 증가시키며 iNOS와 COX-2의 발현 억제를 통해 NO 생성을 40 μ g/mL 이상부터 유의하게 억제하였다. 또한 HepG2에서 고혈당에 의한 glucose uptake와 Glut2 expression, IRS-1 phosphorylation의 조절과 PEPCK와 G6Pase에 활성에 의한 glucose production을 조절하였다. DBCE는 당뇨와 관련된 다양한 기전 제어를 통해 혈당 상승과 인슐린 저항성을 조절하며 향후 당뇨 예방에 유의한 효과를 기대할 수 있다.

감사의 글

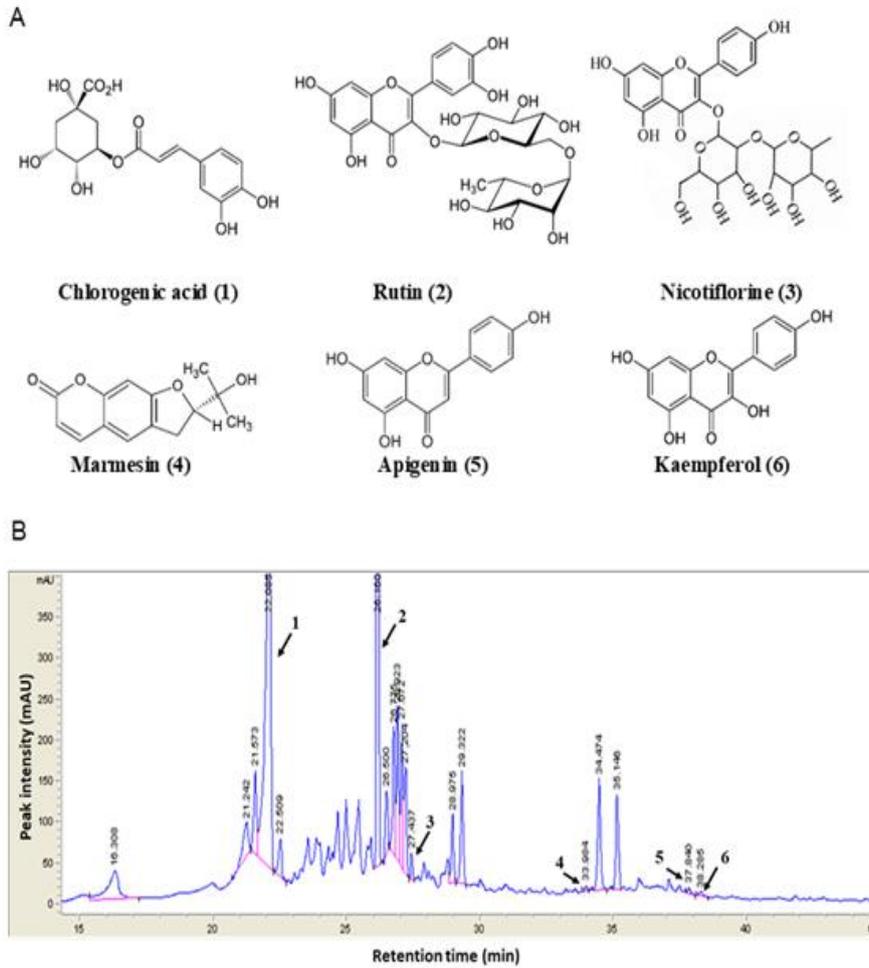
본 연구는 전라남도의 2018년도 지역수요맞춤형연구개발사업(과제번호: B0080711000431)의 지원으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Amer Diabet A, Diagnosis and classification of diabetes mellitus American Diabetes Association. Diabetes care. 2011; 34: S62-S69.
2. Gómez-Valadés AG, Méndez-Lucas A, Vidal-Alabro A, Blasco FX, Chillón M, Bartrons R, Bermudez J, Perales JC, Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. Diabetes. 2008; 57: 2199-210.
3. Evans JMM, Newton RW, Ruta DA, MacDonald TM, Morris AD, Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. Diabetic Med. 2000; 17: 478-80.
4. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. Endocrin Metab Clin. 2010; 39: 481-97.
5. Imamura F, Connor L, Ye Z, Mursu J, Hayashino Y, Bhupathiraju SN, Forouhi NG. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. Brit J Sport Med 2016; 50: 496.
6. Kamata K, Mizukami H, Inaba W, Tsuboi K, Tateishi Y, Yoshida T, Yagihashi S. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented β -cell deficits in type 2 diabetic patients. Amyloid. 2014; 21: 191-201.
7. Rodriguez-Calvo T, Ekwall O, Amirian N, Zapardiel-Gonzalo J, von Herrath MG. Increased Immune Cell Infiltration of the Exocrine Pancreas: A Possible Contribution to the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. Diabetes. 2014; 63: 3880-90.
8. Nopparat J, Nualla-ong A, Phongdara A. Ethanolic extracts of *Pluchea indica* (L.) leaf pretreatment attenuates cytokine-induced β -cell apoptosis in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic mice. Plos One. 2019; 14: e0212133.
9. Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. Drugs. 1999; 58: Suppl 1: 31-39: discussion 75-82.
10. Klover PJ, Mooney RA. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. Int J Biochem Cell B. 2004; 36: 753-8.
11. An NY, Kim J-E, Hwang D, Ryu HK. Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Leveille in streptozotocin-induced diabetes model. J Nutr

- Health. 2014; 47: 394-402.
12. Lee H, Li H, Jeong JH, Noh M, Ryu J-H. Kazinol B from *Broussonetia kazinoki* improves insulin sensitivity via Akt and AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Fitoterapia*. 2016; 112: 90-6.
 13. Bae U-J, Jang H-Y, Lim JM, Hua L, Ryu J-H, Park B-H. Polyphenols isolated from *Broussonetia kazinoki* prevent cytokine-induced β -cell damage and the development of type 1 diabetes. *Exp Mol Med*. 2015; 47: e160.
 14. Bae U-J, Lee DY, Song M-Y, Lee S-M, Park J-W, Ryu J-H, Park B-H. A Prenylated Flavan from *Broussonetia kazinoki* Prevents Cytokine-Induced β -Cell Death through Suppression of Nuclear Factor- κ B Activity. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34: 1026-31.
 15. Kim DH, Lee S, Chung YW, Kim BM, Kim H, Kim K, Yang KM. Antiobesity and Antidiabetes Effects of a *Cudrania tricuspidata* Hydrophilic Extract Presenting PTP1B Inhibitory Potential. *BioMed Res Int*. 2016; 2016: 8432759.
 16. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Tech*. 2000; 11: 419-421.
 17. van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*. 1999; 66: 511-7.
 18. Liu ZQ, Liu T, Chen C, Li MY, Wang ZY, Chen RS, Wei GX, Wang XY, Luo DQ. Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAY mice. *Toxicol Appl Pharm*. 2015, 285: 61-70.
 19. Hunyadi A, Martins A, Hsieh T-J, Seres A, Zupkó I. Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats. *Plos One*. 2012; 7: e50619.
 20. Habtemariam S. α -Glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. *Nat Prod Commu*. 2011; 6: 1934578X1100600211.
 21. Zhang Y, Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic β -cell viability and insulin secretory function. *Eur J Pharmacol*. 2011; 670: 325-32.
 22. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002; 23: 599-622.
 23. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2006; 52: 149-153.
 24. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated β -cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001; 44: 2115-33.
 25. Corbett JA, McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β -cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes*. 1992; 41: 897-903.
 26. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2014; 64: 10-19.
 27. Xu J, Ma M, Purcell WM. Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as in vitro models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. *Toxicol Appl Pharm*. 2003; 189: 100-11.

Figure Legends



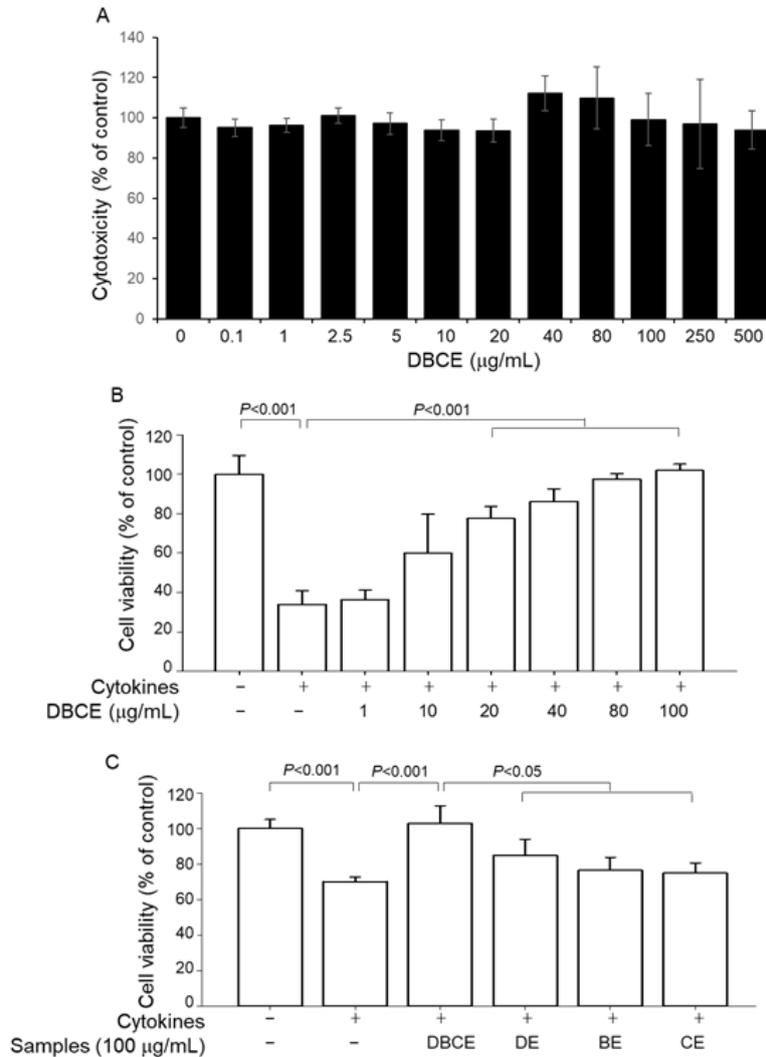


Fig. 2. Effects of DBCE on cytokines-induced decrease of viability in RINm5F cells. (A) Cytotoxicity of DBCE was determined by MTS assay after 48 h. (B) The RINm5F cells (1×10^4) were pretreated with indicated concentrations of DBCE for 1 h, and then treated with cytokines (TNF- α 10 ng/mL, IFN- γ 10 ng/mL, and IL-1 β 5 ng/mL) for 48 h. (C) The RINm5F cells were pretreated with 100 mg/mL of DBCE, DE, BE, and CE for 1 h, and then treated with cytokines (TNF- α 10 ng/mL, IFN- γ 10 ng/mL, and IL-1 β 5 ng/mL) for 48 h. Cell viability was determined by MTS assay. Each value are means \pm SD from three independent experiments and normalized to percentage of control.

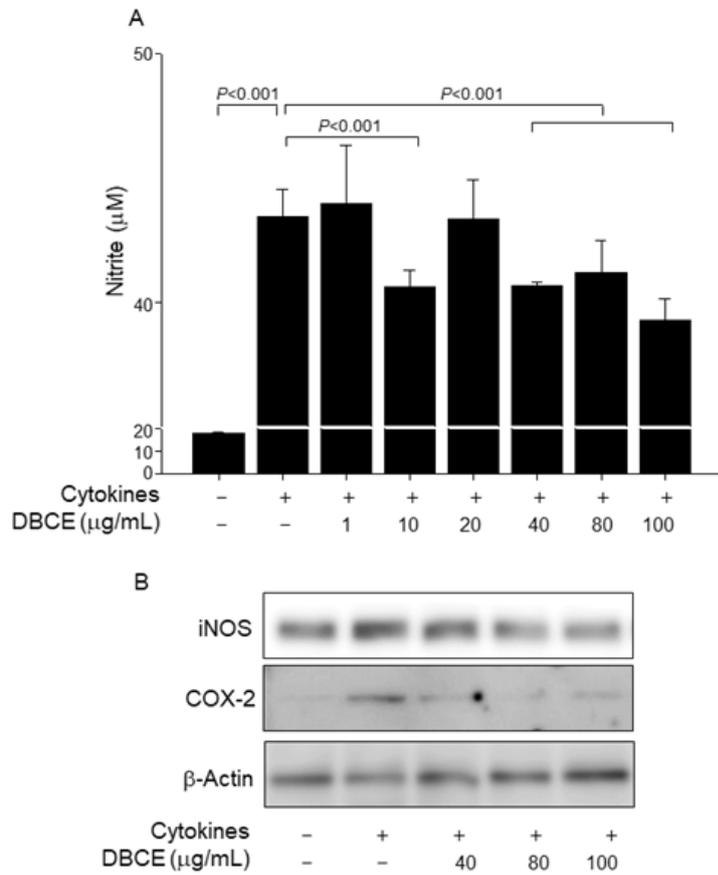


Fig. 3. Inhibitory effects of DBCE on cytokines-induced nitric oxide production and iNOS or COX2 overexpression. RINm5F cells were pretreated with indicated concentrations of DBCE for 1 h, and then followed by cytokines for 24 h. (A) NO production was determined in culture supernatant using Griess reagent. (B) Expression of iNOS and COX-2 were determined by Western blotting. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. (C) Quantification of the target protein bands relative to β -actin. Each value are means \pm SD from three independent experiments.

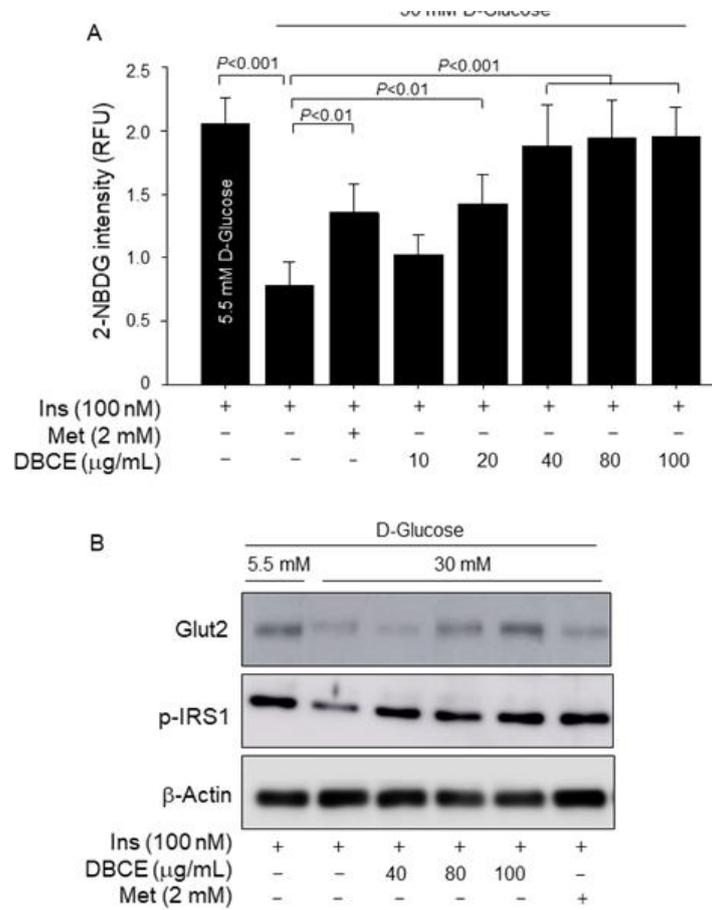


Fig. 4. Protective effects of DBCE on the decreased glucose uptake, Glut2, and phosphorylated IRS1 levels by 30 mM glucose in HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with indicated concentrations of DBCE for 24 h were exposed to 30 mM glucose for additional 24 h and then treated with 100 nM insulin and then followed by cytokines for 24 h. (A) Glucose uptake expressed as relative fluorescence unit (RFU). (B) Expression of Glut2 and p-IRS1 were determined by Western blotting. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Metformin (Met) used as a positive control. Each value are means \pm SD from three independent experiments.

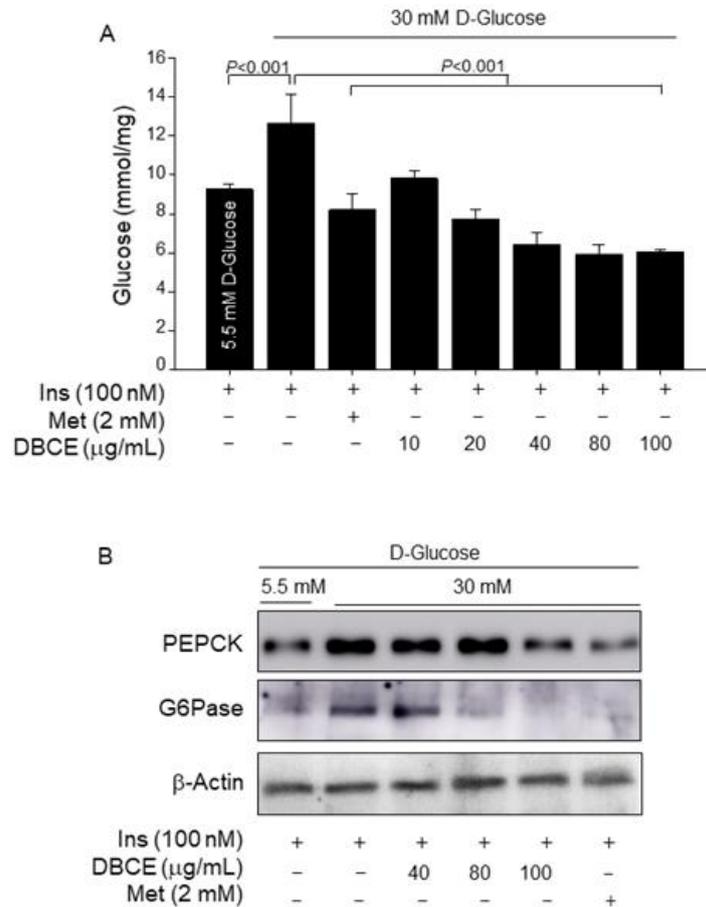


Fig. 5. Effects of DBCE on glucose production and PEPCK and G6Pase overexpression and Glut2, and phosphorylated IRS1 levels by 30 mM glucose in HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with indicated concentrations of DBCE for 24 h were exposed to 30 mM glucose for additional 24 h and then treated with 100 nM insulin and then followed by cytokines for 24 h. (A) Glucose production was expressed as glucose content (mg) which was normalized by total protein content (mg). (B) Expression of PEPCK and G6Pase was determined by Western blotting. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Metformin (Met) used as a positive control. Each value are means \pm SD from three independent experiments.

Table 1. The contents of six flavonoids ($\mu\text{g}/\text{mg}$) in DBCE

| Flavonoids | Content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) |
|------------------|-------------------------------------|
| Chlorogenic acid | 28.06 \pm 1.39 |
| Rutin | 6.44 \pm 0.40 |
| Marmesin | 0.06 \pm 0.00 |
| Nicotiflorine | 0.16 \pm 0.00 |
| Apigenin | 0.28 \pm 0.01 |
| Kaempferol | 13.71 \pm 1.33 |

Each value represents mean \pm SD (n=3)

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging and SOD activity of DBCE

| Sample | DPPH (IC_{50}^*) | ABTS (IC_{50}^*) | SOD (IC_{50}^*) |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| DBCE | 0.016 \pm 0.006** | 0.079 \pm 0.004** | 0.092 \pm 0.003** |
| Ascorbic acid*** | 0.032 \pm 0.001** | – | – |
| Trolox*** | – | 0.010 \pm 0.001** | – |

* IC_{50} value in the concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of sample required for 50% inhibition

**Each value represents mean \pm SD (n=3)

***Ascorbic acid and Trolox are used as positive controls

Table 3. Effect of DBCE on α -glucosidase and α -amylase activity inhibition (AGI and AAI)

| Sample | AGI (IC_{50}^*) | AAI (IC_{50}^*) |
|----------|----------------------------|----------------------------|
| DBCE | 0.016 \pm 0.010** | 0.079 \pm 0.004** |
| Acarbose | 1.398 \pm 0.329** | – |

* IC_{50} value in the concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of sample required for 50% inhibition

**Each value represents mean \pm SD (n=3)

***Acarbose is used as a positive control