

## 전사체 프로파일을 이용한 고려 홍삼의 항당뇨 기전 연구

원해단 · 신은정 · 정성현<sup>#</sup>

경희대학교 약학대학 약물학 임상약학교실

(Received May 1, 2008; Revised August 14, 2008)

### Anti-diabetic Mechanism Study of Korean Red Ginseng by Transcriptomics

Hai Dan Yuan, En Jung Shin and Sung Hyun Chung<sup>#</sup>

Pharmacology and Clinical Pharmacy Lab., College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract** — This study was designed to investigate the anti-diabetic effect and mechanism of Korean red ginseng extract through transcriptomics in C57BL/KsJ db/db mice. The db/db mice were randomly divided into six groups: diabetic control group (DC), red ginseng extract low dose group (RGL, 100 mg/kg), red ginseng extract high dose group (RGH, 200 mg/kg), metformin group (MET, 300 mg/kg), glipizide group (GPZ, 15 mg/kg) and pioglitazone group (PIO, 30 mg/kg), and treated with drugs once per day for 10 weeks. At the end of treatment, we measured blood glucose, insulin, hemoglobin A1c (HbA1c), triglyceride (TG), adiponectin, leptin, non-esterified fatty acid (NEFA). RGL-treated group lowered the blood glucose and HbA1c levels by 19.6% and 11.4% compared to those in diabetic control group. In addition, plasma adiponectin and leptin levels in RGL-treated groups were increased by 20% and 12%, respectively, compared to those in diabetic control. Morphological analyses of liver, pancreas and epididymal adipose tissue were done by hematoxylin-eosin staining, and pancreatic islet insulin and glucagon levels were detected by double-immunofluorescence staining. RGL-treated group revealed higher insulin contents and lower glucagon contents compared to diabetic control. To elucidate an action mechanism of Korean red ginseng, DNA microarray analyses were performed in liver and fat tissues, and western blot and RT-PCR were conducted in liver for validation. According to hierarchical clustering and principal component analysis of gene expression Korean red ginseng treated groups were close to metformin treated group. In summary, Korean red ginseng lowered the blood glucose level through protecting destruction of islet cells and shifting glucose metabolism from hepatic glucose production to glucose utilization and improving insulin sensitivity through enhancing plasma adiponectin and leptin levels.

**Keywords** □ Korean red ginseng, C57BL/KsJ db/db mice, diabetes, DNA microarray

당뇨병(diabetes mellitus)은 대사성 질환으로서 고혈당을 특징으로 하며 췌장에서 인슐린 분비가 부족하거나 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 탄수화물 대사에 이상이 생기는 질환이다.<sup>1,2)</sup> 최근 음식의 서구화와 더불어 비만환자가 급증하면서 제2형 당뇨병이 급증하는 추세는 세계적인 문제로 대두 되고 있는데 현재 한국의 경우도 2030년에는 전체 당뇨병 환자수가 약 722만 명으로 늘어날 것이라고 추정한다.<sup>3,4)</sup> 현재 임상에서 많이 사용하고 있는 경구용 당뇨제제들로는  $\alpha$ -glucosidase 억제제, sulfonylurea계 약물, biguanide계 약물, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) 효능제 등이 있다.<sup>5,6)</sup> 하지만 이런

약물들을 장기적으로 사용 할 때 저혈당, 체중증가 및 간 독성 등 부작용들이 있다고 보고 되어 있다.<sup>7-10)</sup>

한국을 비롯한 여러 아시아의 나라들에서는 민간요법으로 여러 가지 약초들을 당뇨병 및 여러 질병의 치료에 많이 사용하여 왔다. 다양한 연구에 따르면, 고려인삼은 허약한 체질, 숙취, 폐경, 월경불순, 초기 당뇨병, 빈혈, 간 기능 약화, 각종 독성물질에 기인한 중독, 피로, 추위, 스트레스, 산후조리, 체력쇠퇴 등에 효능이 있음이 알려져 있다.<sup>11-13)</sup> 고려 홍삼은 인삼 뿌리(Panax ginseng C.A. Meyer)을 썬서 건조시킨 것으로서 고혈압, 동맥경화, 항암, 항당뇨 작용이 있다고 보고가 되어 있다.<sup>14-18)</sup> 하지만 고려홍삼의 항당뇨 작용은 명확히 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 고려홍삼 물추출물과 기존의 당뇨치료제들인 metformin, glipizide, pioglitazone을 db 마우스에 투여한 후 간에서의 유전자 발현 양상을 비교 분석하여 고려홍삼의 항 당뇨 기전을 살펴보았다.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-961-0373 (팩스) 02-957-0384  
(E-mail) suchung@khu.ac.kr

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

고려홍삼 물 추출물은 KT&G(Seoul, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 고려홍삼 물 추출물 10 g을 2 l 물에 희석하여 동결 건조하였다.

### 실험 동물 및 약물 투여

C57BL/KsJ db/db 5주령의 마우스를 한국 오리엔트사로부터 구입하여 2주 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 Diabetic control(DC); 고려홍삼 엑스 100 mg/kg 투여군(RGL); 고려홍삼 엑스 200 mg/kg 투여군(RGH); metformin 300 mg/kg 투여군(MET); glipizide 15 mg/kg 투여군(GPZ); pioglitazone 30 mg/kg 투여군(PIO)으로 나누며 각 약물은 경구로 10주간 투여하였다.

### 경구 당 부하 시험

실험동물을 12시간 절식한 다음 1.5 g/kg의 glucose를 경구 투여한 후 0분, 30분, 60분, 90분 그리고 120분대에 안와 정맥으로부터 혈액을 채취하였다.<sup>19)</sup> 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 혈장을 이용하여 혈중 포도당 농도를 glucose oxidase method로 측정하였다.

### 혈액 지표 분석

혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 후 실시하였다. 안와정맥을 통해 얻어진 전혈을 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose oxidase method(Trinder method)를 사용하여 측정하였으며 흡광도 측정은 UV Spectrophotometer(U-3210, HITACHITM, Japan)을 사용하였다. 혈중 인슐린 농도는 마우스 insulin ELISA kit(Shibayagi, Japan)을 구입하여 ELISA reader(Labsystems, Finland)로 측정하였다. 당화혈색소는 Hemoglobin A1c kit(BioSystem S.A., Spain)을 이용하여 측정하였고 혈중 중성지방(triglyceride, TG)은 영동제약에서 kit를 구입하여 측정하였다. 혈중 adiponectin은 마우스 adiponectin ELISA kit(Adipogen, Korea)을 구입하여 측정하였으며 혈중 leptin은 마우스 leptin ELISA kit(LINCO research, USA)을 구입하여 측정하였다. 혈중 유리 지방산(non-esterified fatty acid, NEFA)은 kit(에이코화학(주), Japan)을 구입하여 측정하였다.

### 조직의 형태학적 관찰

귀에서 적출한 간, 부고환지방, 췌장조직을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블럭을 제작하고 두께 5  $\mu$ m의 관상 절편으로

제작한 후 xylene으로 파라핀을 제거시키고 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시켰다. 염색 방법으로는 hematoxylin 과 eosin 염색으로 탈수 과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### 면역형광염색 방법으로 췌장 islet에서 insulin과 glucagon의 관찰

두께 5  $\mu$ m 관상 절편을 xylene으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시켰다. PBS로 씻은 후 0.1% trypsin으로 단백질 구조를 회복시키고 primary antibody인 goat anti-insulin(Santa Cruz, USA)을 1:75로 희석하여 붙이고 이어서 secondary antibody인 donkey anti-goat IgG-FITC(Santa Cruz, USA)을 1:200으로 희석하여 붙였으며 같은 조직에 두 번째 primary antibody인 rabbit anti-mouse(Santa Cruz, USA)를 붙이고 두 번째 secondary antibody인 goat anti-rabbit IgG-TRITC(Santa Cruz, USA)을 붙인 후 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### RNA 분리

조직에서 total RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다.<sup>20)</sup> 물 층에 있는 total RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Mouse로부터 추출한 total RNA의 상태를 확인하는 방법으로 pH 8.0의 RNase-free water에서 OD260/280 비율이 1.8 이상, 28S rRNA와 18S rRNA 비율이 1.6 이상일 경우 가장 최적의 RNA로 판단하였다.

### Microarray analysis

Agilent 60-mer oligo Microarray protocol에 따라 cy3 또는 cy5가 결합된 aminoallyl-UTP로 준비된 RNA를 증폭 시킨 뒤 oligo microarray(Mouse 44 K)와 60°C에서 16시간 동안 hybridization 시켰다. Hybridization된 chip은 non-confocal laser scanner인 GenePix4000B(Axon Instruments, CA, USA)로 scanning하였다. Scanning하여 얻은 image는 16 bit TIFF file로 저장한 후 GenePix v6.0 software를 사용하여 image 분석을 하였다. Locally weighted scatter-plot smoother(LOWESS) normalization 방법을 사용하여 normalization 하였다. Microarray 데이터의 분석을 위해서 hierarchical clustering, principal component analysis 방법을 사용하였으며 유전자의 군집화를 통해 유사한 발현 양상을 보이는 그룹을 확인하였다. 분석 프로그램은 multiexperiment viewer(MeV) software를 이용하였다.

### 간 조직에서 AMPK 발현 측정

간 조직에서 5'-AMP activated protein kinase(AMPK)

발현을 확인하고자 Western blot 방법으로 phospho-5'-AMP activated protein kinase(P-AMPK), AMPK, phospho-acetyl CoA carboxylase(P-ACC), acetyl CoA carboxylase(ACC)를 측정하였다. 단백질 분석을 위해 간 조직을 lysis buffer를 이용하여 균질화하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay reagent(Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였으며, 정량한 단백질 20 µg을 8% SDS-PAGE로 분리하였다. 이 후 gel을 membrane(Milipore, Cat. No: IPVH00010)에 transfer하고 5% skim milk로 상온에서 1시간 blocking 하였으며 1:3000 비율로 희석시킨 primary antibody (P-AMPK, AMPK, P-ACC, ACC)와 4°C에서 overnight 하였다. Tris-buffered saline tween-20(TBST)로 4번 washing 한 후 1:5000의 비율로 희석시킨 secondary antibody와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이 후 TBST로 4번 washing하고 ECL solution (Amersham, Sweden)을 이용하여 X-ray 필름에 developing 하였다.

#### 간 조직에서 RT-PCR

DNA microarray 실험을 통하여 특이적인 발현을 보이는 유전자를 선별하여 RT-PCR을 진행하였다. 총 RNA 10 µg을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 Oligo(dT) 15 primer를 이용하여 역전사하였다. Primer의 종류 및 서열은 다음과 같다. SREBP1a(Sterol regulatory element-binding proteins)의 주형사 서열은 GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA, 비주형사 서열은 TGC TGC CAA AAG ACA AGG G; FAS(Fatty acid synthesis)의 주형사 서열은 GAT CCT GGA ACG AGA ACA C, 비주형사 서열은 AGA CTG TGG AAC ACG GTG GT; SCD1(Stearoyl CoA desaturase)의 주형사 서열은 CGA GGG TTG GTT GAT CTG T, 비주형사 서열은 ATA GCA

CTG TTG GCC CTG GA; GPAT(Glycerol-3-phosphate acyltransferase)의 주형사 서열은 GGT AGT GGA TAC TCT GTC GTC CA, 비주형사 서열은 CAT CAG CAA CAT CAT TCG GT; CD36의 주형사 서열은 TCC TCT GAC ATT TGC AGG TCT ATC, 비주형사 서열은 GTG AAT CCA GTT ATG GGT TCC AC; PPAR-α(Peroxisome proliferator activated receptor-α)의 주형사 서열은 CCC TGA ACA TCG AGT GTC GA, 비주형사 서열은 CTT GCC CAG AGA TTT GAG GTC CT; CPN의 주형사 서열은 ATG GTC AAC CCC ACC GTG, 비주형사 서열은 TTA GAG TTG TCC ACA GTC GGA GA; PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 주형사 서열은 ATG CCT CCT CAG CTG CAT A, 비주형사 서열은 TTA CAT CTG GCT GAT TCT CTG TT이다. PCR 반응 조건은 SREBP-1a, FAS, PPAR-α, CPN, PEPCK의 경우 95°C에서 30초 동안 변성, 57°C에서 30초 동안 불임, 72°C에서 30초 동안 연장을 하여 총 30 cycle 하였으며 SCD1, GPAT의 경우는 95°C에서 30초 동안 변성, 57°C에서 30초 동안 불임, 72°C에서 30초 동안 연장을 하여 총 26 cycle 하였으며 CD36의 경우는 95°C에서 30초 동안 변성, 51°C에서 30초 동안 불임, 72°C에서 30초 동안 연장을 하여 총 30 cycle 하였다. 이후 반응 생성물을 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 전기영동 하였다. CPN은 증폭된 유전자들의 대조군으로 사용되었다.

#### 자료 분석 및 통계 처리

모든 실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 당뇨 대조군(DC)과 비교하여 통계적 유의성을 Student's *t*-test로 처리하였으며  $p < 0.05$  이하인 경우 유의성 있는 차이가 있는 것으로 판정하였다.

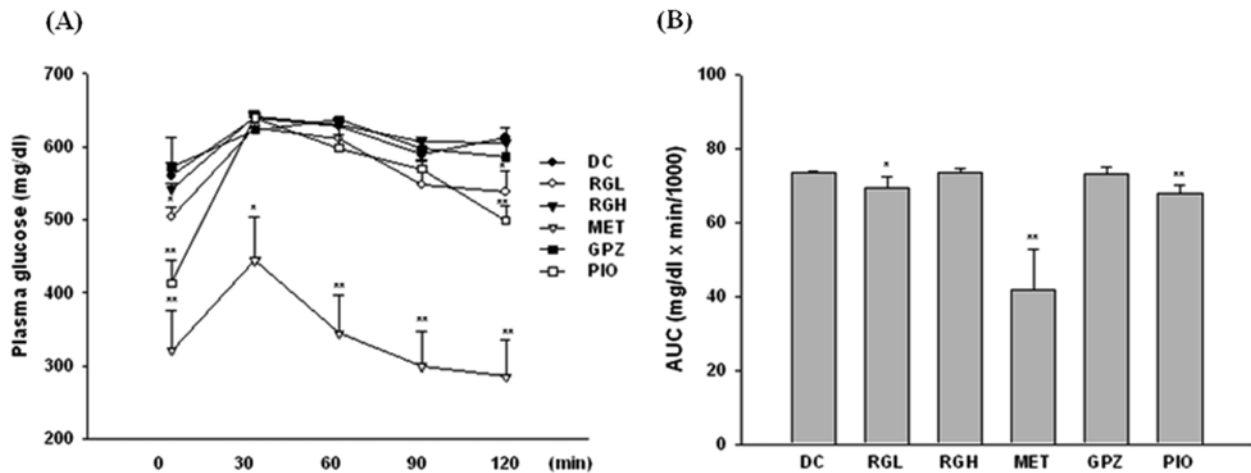


Fig. 1 – Effects of RG, MET, GPZ & PIO on oral glucose tolerance test (A). Animals fasted overnight were given on oral glucose load of 1.5 g/kg after oral administration of either vehicle or RG, MET, GPZ, PIO. (B) Area under the blood-glucose concentration curve was measured over 120 min (AUC-120 min). Values represent as mean±S.E. (n=4). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. DC.

**실험결과 및 고찰**

**경구 당부하시험**

Fig. 1은 마우스에 10주간 약물을 경구 투여한 후 측정된 경구 당 부하시험 결과를 나타낸 그림이다. Fig. 1A는 120분 동안의 혈당 변화를 나타낸 것이며 B는 각 그룹의 곡선 하 면적(area under the curve, AUC)을 비교한 그림으로 당뇨 대조군과 비교 시 RGL, MET, PIO 그룹에서 곡선 하 면적이 감소함을 알 수 있었다.

**혈액 지표 분석**

Table I은 10주 동안 약물을 경구 투여한 후, 12시간 절식시켜 공복 상태의 실험동물에서 전혈을 채취한 후 측정된 포도당, 인슐린, 당화혈색소, 인슐린저항성지수(HOMA-IR), 중성지방, 유리지방산 그리고 지방세포에서 분비되는 adipokine인 adiponectin 과 leptin의 농도를 나타낸 것이다. 당뇨 대조군에 비해 RGL 투

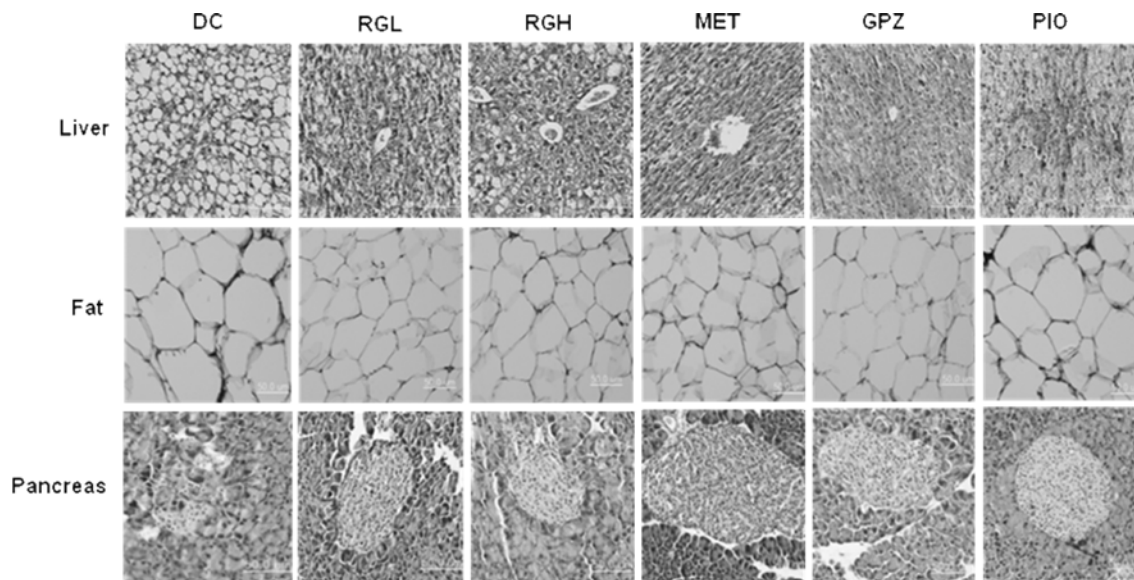
여군은 혈당이 19.8%( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, RGH 또한 당뇨 대조군에 비해 혈당이 18.3%( $p < 0.05$ ) 감소하였다. 그러나 인슐린 수치는 고려홍삼 투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 MET 투여군과 PIO 투여군은 당뇨 대조군에 비해 각각 67.9%( $p < 0.001$ )와 56.9%( $p < 0.001$ ) 감소하였다. 인슐린저항성 지수(HOMA-IR)는 당뇨 대조군에 비해 RGL 투여군에서 27.7% 감소하였으며 양성약물 대조군에서 각각 80.8%, 41.1% 그리고 68.9% 감소하였다. HbA1c는 당뇨 대조군에 비해 RGL 투여군, RGH 투여군, MET 투여군, GPZ 투여군, PIO 투여군에서 각각 11%, 6.4%, 18.9%, 16.1%, 27.9% 감소하였다.

지방세포에서 지방분해(lipolysis)는 인슐린에 의해 억제된다. 그러나 인슐린저항성 상태에서는 지방분해가 억제되지 못한 결과 혈중 유리지방산(non-esterified fatty acid, NEFA)의 수치는 올라가게 된다. 이렇게 상승된 유리지방산은 근육과 지방조직으로 포도당이 유입되는 것을 방해하며 간에서 당생성을 촉진하게 된다.<sup>21)</sup> 또한 장기적인 유리지방산의 상승은 체장에서 인슐린 분

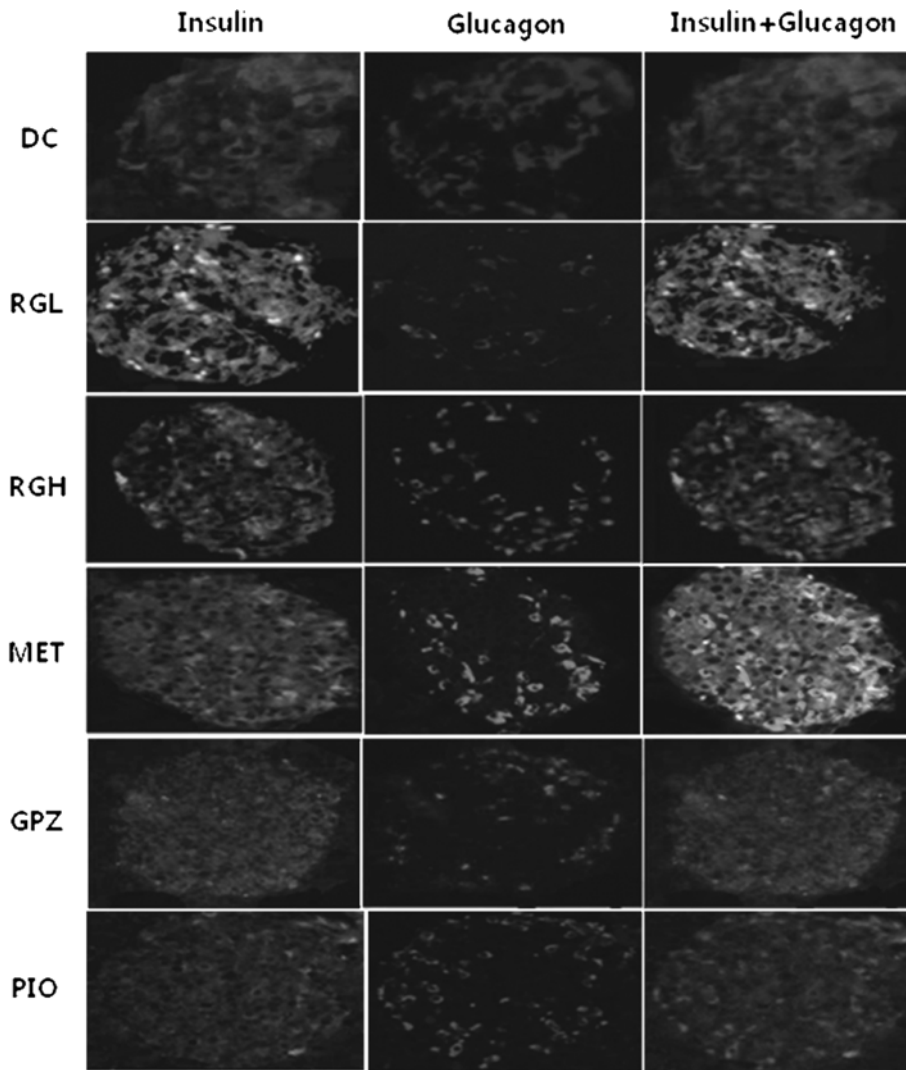
**Table I** – Metabolic parameters in Korean red ginseng treated db/db mice

Parameter	DC	RGL	RGH	MET	GPZ	PIO
Glucose (mM)	15.8±0.9	12.7±1.3*	12.9±0.4*	5.1±0.4***	7.4±2.1***	6.8±0.6***
Insulin (μU/ml)	240.6±57.1	216.6±18.2	272.1±50.3	143.0±37.0*	302.6±28.3	173.9±33.2*
HOMA-IR	168.9±46.3	122.3±22.4	156.0±30.0	32.4±13.0*	99.5±41.3	52.5±8.2*
HbA1c (%)	7.0±0.2	6.2±0.2*	6.6±0.3*	5.7±0.2**	5.9±0.2**	5.1±0.3***
Adiponectin (μU/ml)	31.5±1.6	38.0±1.3*	32.8±2.1	29.5±2.3	24.9±2.3	61.9±5.5**
Leptin (ng/ml)	54.5±1.3	61.1±1.1**	58.0±1.3	57.6±1.1	58.6±1.4*	57.0±0.8
TG (mg/ml)	94.9±9.4	77.0±1.6	95.9±5.2	65.4±4.9*	80.9±9.0	89.0±5.8
NEFA (μeqiv/l)	2179.3±78.0	1812.8±44.7***	2278.6±173.3	1936.3±204.5	2022.8±442.0	1550.4±62.4***

Data are mean±standard error (n=4). Homeostasis model assessment was used to calculate an index of insulin resistance as insulin (μU/ml)×glucose (mM)/22.5. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to diabetic control group.



**Fig. 2** – Microscopic view of the liver, fat and pancreas sections obtained from DC, RGL, RGH, MET, GPZ and PIO treated groups. H & E, magnification×200.



**Fig. 3** – Double-immunofluorescence staining of insulin and glucagon in a db mouse pancreatic islet. Insulin and glucagon were coded in green and red color, respectively. magnification×200.

비도 방해하는 결과를 낳는다.<sup>22)</sup> Table I에서 RGL 투여군은 당뇨 대조군과 비교 시 혈중 유리지방산의 수치가 16.8% 감소하였다. 비록 고려홍삼은 용량의존적으로 혈중 유리지방산의 수치를 낮추어주지는 못하였지만 저용량에서 17% 가까이 유리지방산 수치를 낮추어 주었고 이는 포도당 항상성에 유리한 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. 또한 RGL 투여군은 통계적으로 유의하지는 않았지만 혈중 중성지방 역시 DC군에 비해 18.9% 감소시켰다.

포도당 항상성에 다양한 영향을 미치는 지방세포에서 유리되는 adipokine인 adiponectin과 leptin 호르몬의 수치를 그룹간 비교해 보았다. apM1, GBP28, AdipoQ 혹은 ACRP30으로 불리우기도 하는 adiponectin은 분자량 30 kDa의 유리단백질로 비만 당뇨쥐에 투여할 경우 간과 근육조직에서 AMPK activity를 촉진시키고 결과 지방산 산화와 인슐린 반응성을 증가시키는 활성이

있음이 알려지고 있는 물질이다.<sup>23,24)</sup> 비만, 인슐린저항성, 2형 당뇨, 대사증후군, 고지혈증, 고혈압, 산화적 스트레스를 보이는 사람이나 탄수화물 고함유 식이를 섭취하는 경우 혈중 adiponectin은 감소하는 경향을 보이는 반면 체중을 줄이거나 콩 단백질, 피

**Table II** – Number of the significant up- or down-regulated genes in hepatocytes and adipocytes treated with red ginseng or oral hypoglycemics

	Up-regulated (>1.5-fold)		Down-regulated (<1.5-fold)	
	Liver	Fat	Liver	Fat
RGL	1453	3496	1540	3658
RGH	2387	4045	1513	4725
RGL+RGH	461	1410	261	1266
MET	3383	3352	2333	4006
GPZ	4250	4837	3025	7397
PIO	4942	3973	4511	4944

오글리타존 같은 PPAR- $\gamma$  agonist 약물을 투여하면 혈중 adiponectin level이 증가한다.<sup>25)</sup> 따라서 혈 중 adiponectin 수치의 증가는 인슐린의 작용성이 증가되었다는 근거가 될 수 있다. Table I에서 보듯이 RGL군에서는 DC군에 비해 adiponectin 및 leptin 수치가 20.6%, 12.1% 증가되었다.

이 결과로부터 고려홍삼은 인슐린 작용성을 증가시키고 지방 산 산화를 촉진하는 물질들인 adiponectin과 leptin의 혈중 농도

를 증가시키는 활성이 있음을 알 수 있었다.

**조직의 형태학적 관찰**

Fig. 2는 홍삼이 간, 부고환 지방 및 췌장 형태에 미치는 영향을 살펴본 결과이다. 간 조직의 hematoxylin-eosin염색 결과에서 홍삼 투여군은 DC군에서 많이 보이는 지방구(lipid droplets)들이 거의 사라진 것을 볼 수 있었고 지방조직의 염색 결과에서는

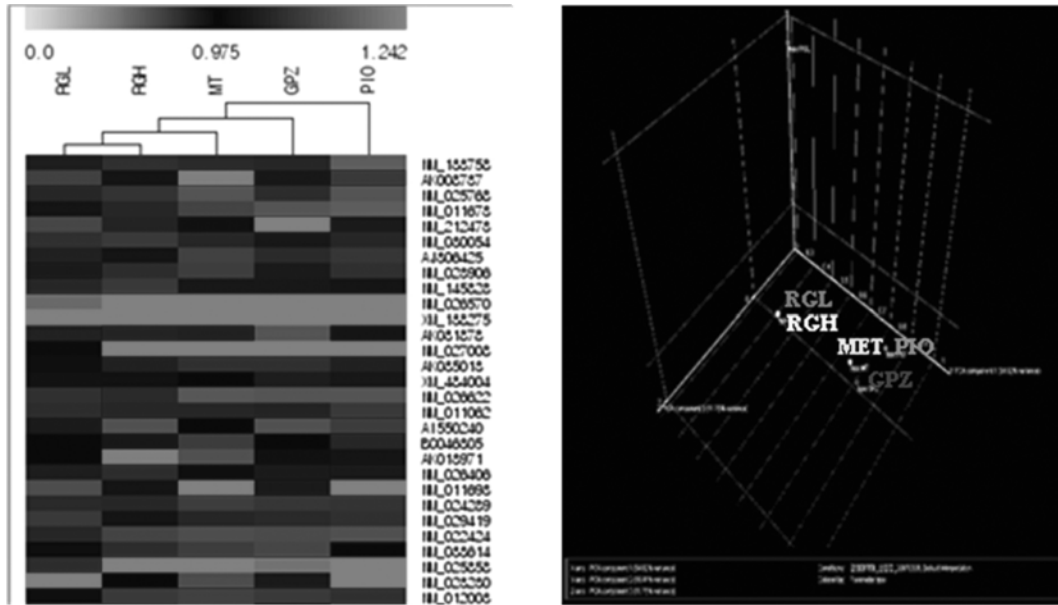


Fig. 4 – Hierarchical clustering analysis and principal component analyses of gene expression data. Expression profile data were derived from pooled RNA of the livers of db mice treated with Korean red ginseng and oral hypoglycemics.

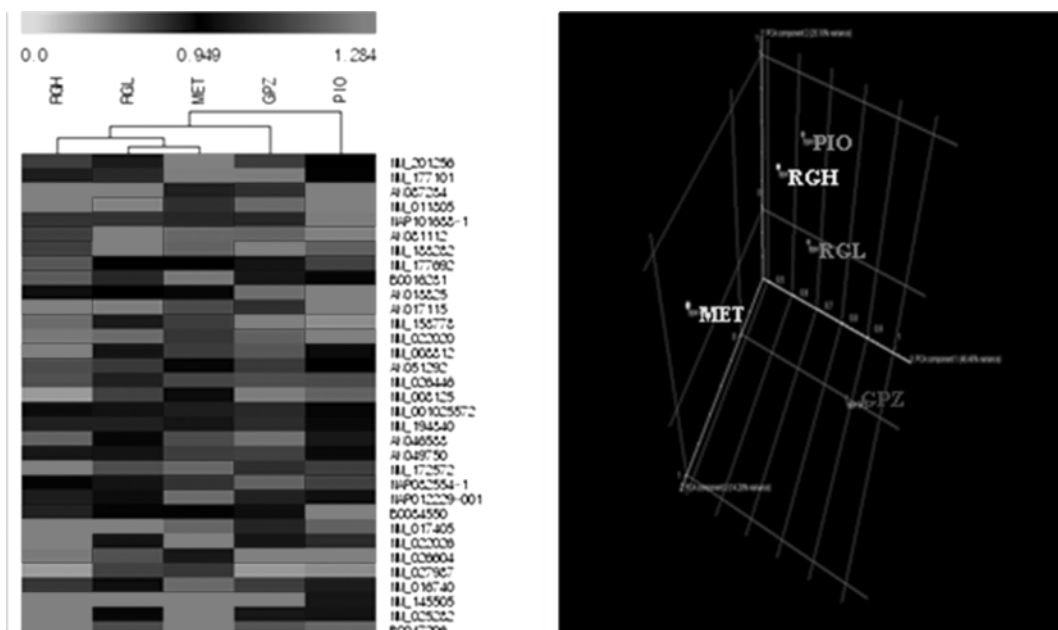


Fig. 5 – Hierarchical clustering and principal component analyses of gene expression data. Expression profile data were derived from pooled RNA of the fats of animals treated with red ginseng and oral hypoglycemics.

홍삼 투여군의 지방 size가 DC군에 비하여 현저히 작아졌음을 알 수가 있었다. 췌장 조직의 형태학적 관찰 결과에서 DC군 마우스의 islets은 모양이 불규칙적이고 구조가 파괴된 양상을 보였지만 홍삼 투여군의 islets은 DC군 마우스에 비하여 모양이나 구조가 뚜렷하였다. Fig. 3은 췌장 islets에서 insulin과 glucagon의 발현을 면역형광 염색하여 관찰한 결과이다. DC에 비하여 홍삼 투여 군에서 insulin의 발현은 증가하였으나 glucagon의 발현은 감소하였다. 이 결과는 홍삼 추출물이 비만성 당뇨의  $\beta$ -cell에서 insulin의 분비를 촉진시키고 동시에  $\alpha$ -cell에서 glucagon의 분비를 억제함으로써 혈당을 떨어뜨림을 알 수 있었다.

### Microarray 분석

간에서 36,910개의 유전자를 분석한 결과 DC군에 비해 1.5배 이상 높게 나타난 유전자는 홍삼 투여군에서 461개였고 반대로

1.5배 이상 낮게 나타난 유전자는 261개였다(Table II). 지방에서는 34,713개의 유전자를 분석한 결과 홍삼 투여군에서 DC군에 비해 1.5배 이상 높게 나타난 유전자는 1410개였고 1.5배 이상 낮게 나타난 유전자는 1266개였다(Table II). 그리고 간과 지방에서 각각 36,910개, 34,713개의 유전자를 사용하여 hierarchical clustering analysis와 principal component analysis를 하였다. Hierarchical clustering은 전체 유전자의 발현양상을 분석하여 그 패턴이 비슷한 유전자 또는 투여군을 묶어주는 방법으로 홍삼에 의한 유전자 발현을 기존의 항당뇨 약물과 비교할 수 있다. 발현이 증가된 것은 붉은색으로 발현이 감소한 것은 녹색으로 나타내었다. 간에서는 RGL 투여군과 RGH 투여군의 발현양상이 비슷한 것으로 나타났고 항당뇨 약물 중에서는 MET 투여군과 가장 가까운 것으로 나타났고(Fig. 4). 지방에서는 간의 발현 패턴과는 달리 RGL 투여군이 RGH 투여군보다 MET 투여군과 더

**Table III** – Differentially expressed genes in the liver of RG-treated db/db mice

Accession No.	Gene Name	Fold	Function
<i>UP-regulated</i>			
NM_15729	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	1.751	fatty acid metabolism
L38988	Glucokinase	1.451	PPAR signalling glycolysis/gluconeogenesis
AK083075	Liver glycogen phosphorylase	1.5	insulin signaling
NM_010719	Lipase, hormone sensitive	1.499	insulin signaling
NM_019703	Phosphofructokinase, platelet	1.441	insulin signaling glycolysis/gluconeogenesis
NM_019468	Glucose-6-phosphate dehydrogenase 2	1.502	pentose phosphate
NM_013474	Apolipoprotein A-II	2.172	PPAR signaling
NM_007980	Fatty acid binding protein 2, intestinal	1.571	PPAR signaling
NM_010634	Fatty acid binding protein 5, epidermal	1.277	PPAR signaling
NM_011978	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	1.594	PPAR signaling
NM_011977	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	2.456	PPAR signaling
<i>Down-regulated</i>			
NM_013495	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	0.785	adipocytokin signaling fatty acid metabolism PPAR signaling
NM_008061	Glucose-6-phosphatase, catalytic	0.671	adipocytokin signaling glycolysis/gluconeogenesis Insulin signaling
NM_028994	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	0.698	adipocytokin signaling insulin signaling PPAR signaling
NM_001013367	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	0.679	pyruvate metabolism adipocytokin signaling Insulin signaling
NM_178143	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	0.696	adipocytokin signaling Insulin signaling
AF374167	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	0.75	fatty acid biosynthesis insulin signaling pyruvate metabolism
NM_007988	Fatty acid synthase	0.762	fatty acid biosynthesis Insulin signaling
NM_008509	Lipoprotein lipase	0.737	PPAR signaling
NM_009128	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	0.639	PPAR signaling

비슷한 양상을 띄는 것으로 나타났다(Fig. 5).

**간에서 유전자의 발현**

Table III은 간 전체 유전자중에서 DC 군에 비하여 1.2배 이상으로 나타났거나 0.8배 이하로 나타난 당뇨 관련 유전자를 선별한 결과이다. 이 결과에서 고려 홍삼은 간에서 탄수화물 대사에 영향을 주는 것으로 나타났다. Glucokinase(GK), phosphoenolpyruvate caboxykinase(PEPCK), glucose-6-phosphatase(G6pase) 그리고 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)는 glucose가 glycogen으로 저장되는 key enzyme 들이다.<sup>26)</sup> 그 중에서 PEPCK와 G6pase는 gluconeogenesis 과정에 촉매 작용을 하고 G6PD는 pentose phosphate pathway에 작용하는 enzyme으로 glucose metabolism에 결정적인 작용을 한다.<sup>27,28)</sup> 당뇨병 환자는 간에서 gluconeogenesis에 관여하는 G6pase나 PEPCK 같은 gene들의 발현이 증가하고 GK나 G6PD 같은 gene들의 발현은 감소한다.<sup>29,30)</sup> 본 연구에서 glycolysis 관련 gene인 glucokinase는 발현이 1.451배 증가하였고 pentose phosphate pathway에 관련 gene인 glucose-6-phosphate dehydrogenase 2는 1.502배 증가하였다. 반면 gluconeogenesis 관련 gene인 PEPCK2는 발현이 0.698배 감소하였고 glucose-6-phosphatase는 0.671배 감소하였다. Lipogenic gene인 fatty acid synthase(FAS)와 steroyl-Coenzyme A desaturase 1(SCD 1)은 각각 0.762배와 0.639배 감소하였다. 이 결과를 종합하면 고려홍삼은 간조직에서 탄수화물과 지질의 대사에 영향을 미쳐 인슐린 작용성을 증가시키고 포

도당 생성을 억제하는 활성이 있음을 알수 있었다.

**선별된 marker들의 validation**

홍삼의 항당뇨 활성 작용기전이 metformin과 가장 유사하다는 결론을 근거로 AMPK를 중심으로 marker 들의 발현을 Western blot 혹은 RT-PCR로 검증하였다. 간 조직에서 AMPK 발현은 Western blot 방법으로 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 홍삼은 용량의존적으로 AMPK를 현저하게 phosphorylation 시켰으며 ACC 역시 현저하게 phosphorylation 시켰다. ACC 효소가 인산화되면 활성은 떨어지고 결과 반응생성물인 malonyl CoA의 농도가 떨어져 지방산 산화를 위해 미토콘드리아로 지방산을 전달하는 역할을 수행하는 효소인 carnitine palmitoyltransferase-1(CPT1)의 활성이 증가하여 결과 지방산의 산화가 촉진된다.<sup>31)</sup> 따라서 홍삼이 간에서 AMPK를 인산화시킨다는 실험결과는 지방산 산화를 촉진하여 TG 축적을 저해하여 인슐린 반응성을 높인다는 기전으로 설명이 가능하다. 이어서 홍삼의 AMPK 활성화 결과를 검증하기 위해 target gene들 (lipogenesis, lipolysis, gluconeogenesis관련 유전자들)의 발현을 RT-PCR로 측정된 결과(Fig. 7) 홍삼은 SREBP1a, FAS, SCD1, GPAT 등 지방 합성에 관련되는 gene들의 발현을 현저하게 억

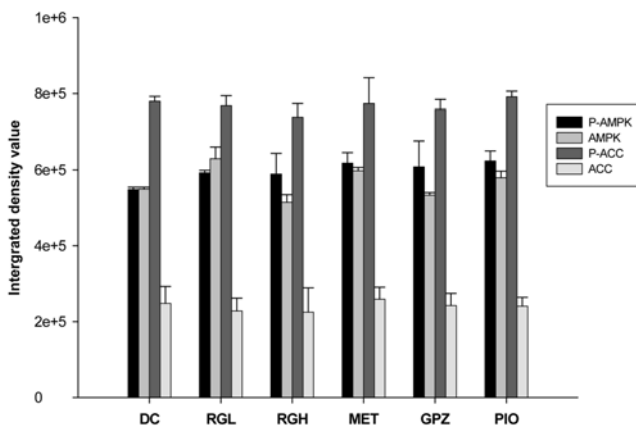
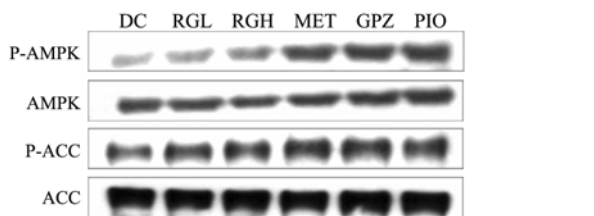


Fig. 6 – Western blot analysis of phospho-AMPK, AMPK, phospho-ACC, ACC levels in liver.

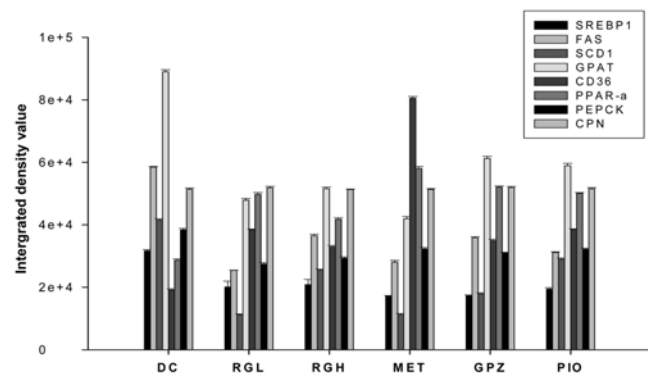
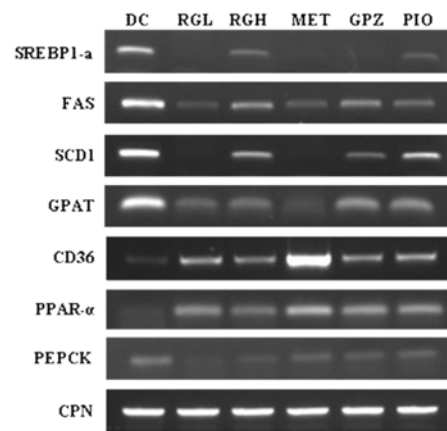


Fig. 7 – RT-PCR analyses of SREBP1-α, FAS, SCD1, GPAT, PPAR-α, CD36 and PEPCK genes in liver.



제한 반면 CD36, PPAR- $\alpha$  등 lipolysis gene 들의 발현은 현저하게 증가시켰다. 또한 당신생과정에서 rate-limiting enzyme인 PEPCK gene의 발현도 DC에 비하여 감소시켰다.

## 결 론

이상의 결과들을 요약하면 홍삼은 체장에서 insulin 분비를 촉진하는 반면 glucagon의 분비를 억제하여 혈당을 강하하였고 hierarchical clustering 및 principal component analysis 결과 홍삼의 당뇨 관련 유전자 발현 양상은 metformin과 가장 유사하였으며, 간에서 AMPK activation과 ACC inactivation을 통하여 fatty acid  $\beta$ -oxidation을 촉진하였고 SREBP1a, FAS, SCD1, GPAT 등 lipogenesis gene들의 발현을 억제하여 간에서 지방산의 합성을 억제하며 CD36, PPAR- $\alpha$  등 lipolysis gene들의 발현을 증가하여 인슐린저항성을 개선시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 홍삼은 간 조직에서 AMPK signaling pathway를 활성화시켜(지방세포에서 분비되는 adipokine인 adiponectin 유리에 의해) 지방산의 산화를 촉진한 결과 중성지방의 축적을 차단하여 인슐린저항성을 개선하고 또한 당신생을 억제하여 (PEPCK, G6Pase 발현을 억제함으로) 공복 시 혈당을 감소시키는 것으로 사료된다. 고려홍삼은 비만한 2형 당뇨병환자에서 metformin과 같이 인슐린저항성을 개선하여 공복 시 혈당을 낮추어 주는 그러나 metformin이 나타낼 수 있는 lactic acidosis와 같은 부작용은 없는 안전한 혈당강하제로 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2008년도 자생식물이용기술개발사업단(과제번호 M106KD010018-08K0401-01810)의 지원을 받아 수행되었습니다.

## 문 헌

- 1) Ugochukwu, N. H. and Figgers, C. L. : Modulation of the flux patterns in carbohydrate metabolism in the livers of streptozotocin-induced diabetic rats by dietary caloric restriction. *Pharmacol. Res.* **54**, 172 (2006).
- 2) Cho, W. C., Chung, W. S., Lee, S. K., Leung, A. W., Cheng, C. H. and Yue, K. K. : Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **550**, 173 (2006).
- 3) 2005 당뇨병기초 통계연구 TFT (대한 당뇨병 학회, 건강보험심사평가원) 자료.
- 4) Kim, Y. M., Cha, B. S., Kim, D. J., Choi, S. H., Kim, S. K., Ahn,

- C. W., Lim, S. K., Kim, K. R., Huh, K. B. and Lee, H. C. : Predictive clinical parameters for therapeutic efficacy of rosiglitazone in Korean type 2 diabetes mellitus. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* **67**, 43 (2005).
- 5) Zhang, B. B. and Moller, D. E. : New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 461 (2000).
- 6) Bailey, C. J. : Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1511 (1999).
- 7) Scheen, A. J. : Thiazolidinediones and liver toxicity *Diabetes. Metab.* **27**, 305 (2001).
- 8) Belcher, G., Lambert, C., Edwards, G., Urquhart, R. and Matthews, D. R. : Safety and tolerability of pioglitazone, metformin, and gliclazide in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **70**, 53 (2005).
- 9) Stades, A. M., Heikens, J. T., Erkelens, D. W., Holleman, F. and Hoekstra, J. B. : Metformin and lactic acidosis: cause or coincidence? A review of case reports. *J. Intern. Med.* **255**, 179 (2004).
- 10) Kobayashi, M., Iwata, M. and Haruta, T. : Clinical evaluation of pioglitazone. *Nippon. Rinsho.* **58**, 395 (2000).
- 11) Coleman, C. I., Hebert, J. H. and Reddy, P. : The effects of Panax ginseng on quality of life. *J. Clin. Pharm. Ther.* **28**, 5 (2003).
- 12) Bucci, L. R. : Selected herbals and human exercise performance. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 624S (2000).
- 13) Tokuyama, S. and Takahashi, M. : Pharmacological and physiological effects of ginseng on actions induced by opioids and psychostimulants. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* **117**, 195 (2001).
- 14) Ryu, J. K., Lee, T., Kim, D. J., Park, I. S., Yoon, S. M., Lee, H. S., Song, S. U. and Suh, J. K. : Free radical-scavenging activity of Korean red ginseng for erectile dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Urology*, **65**, 611 (2003).
- 15) Shin, H. J., Kim, Y. S., Kwak, Y. S., Song, Y. B., Kim, Y. S. and Park, J. D. : Enhancement of antitumor effects of paclitaxel (taxol) in combination with red ginseng acidic polysaccharide (RGAP). *Planta. Med.* **70**, 1033 (2004).
- 16) Wargovich, M. J. : Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals. *J. Korean Med. Sci.*, **16**, S81 (2001).
- 17) Sung, J., Han, K. H., Zo, J. H., Park, H. J., Kim, C. H. and Oh, B. H. : Effects of red ginseng upon vascular endothelial function in patients with essential hypertension. *Am. J. Chin. Med.* **28**, 205 (2000).
- 18) Vuksan, V., Sung, M. K., Sievenpiper, J. L., Stavro, P. M., Jenkins, A. L., Di Buono, M., Lee, K. S., Leiter, L. A., Nam, K. Y., Arnason, J. T., Choi, M. and Naeem, A. : Korean red ginseng (Panax ginseng) improves glucose and insulin

- regulation in well-controlled, type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **18**, 46 (2008).
- 19) Han, G. C., Ko, S. K., Sung, J. H. and Chung, S. H. : Compound K enhances insulin secretion with beneficial metabolic effects in db/db mice. *J. Agric. Food. Chem.* **55**, 1064 (2007).
- 20) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987).
- 21) Stich, V. and Berlan, M. : Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 369 (2004).
- 22) Raz, I., Eldor, R., Cernea, S. and Shafir, E. : Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **21**, 3 (2005).
- 23) Wang, Y., Lam, K. S., Yau, M. H. and Xu, A. : Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem. J.* **409**, 623 (2008).
- 24) Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A. and Prins, J. B. : Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes. Obes. Metab.* **8**, 264 (2006).
- 25) Aguilera, C. M., Gil-Campos, M., Cañete, R. and Gil, A. : Alterations in plasma and tissue lipids associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin. Sci. (Lond)* **114**, 183 (2008).
- 26) Scott, D. K., O'Doherty, R. M., Stafford, J. M., Newgard, C. B. and Granner, D. K. : The repression of hormone-activated PEPCK gene expression by glucose is insulin-independent but requires glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **273**, 24145 (1998).
- 27) Lochhead, P. A., Salt, I. P., Walker, K. S., Hardie, D. G. and Sutherland, C. : 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes.* **49**, 896 (2000).
- 28) Ho, H. Y., Cheng, M. L. and Chiu, D. : TGlucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox. Rep.* **12**, 109 (2007).
- 29) Aoyama, H., Daitoku, H. and Fukamizu, A. : Nutrient control of phosphorylation and translocation of Foxo1 in C57BL/6 and db/db mice. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 433 (2006).
- 30) Ugochukwu, N. H. and Babady, N. E. : Antihyperglycemic effect of aqueous and ethanolic extracts of *Gongronema latifolium* leaves on glucose and glycogen metabolism in livers of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life. Sci.* **73**, 1925 (2003).
- 31) Velasco, G., Geelen, M. J. and Guzmán, M. : Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 169 (1997).