

가시오가피 추출물의 항당뇨 활성 및 GLUT4 유전자 발현에 미치는 영향

정의수 · 박종필 · 최 한¹ · 장경순² · 강신호³ · 강세친^{3,*} · 지옥표
성균관대학교 약학대학, 경기의약연구소¹ (주)일송정², 세명대학교 자연약재과학과³

Effects of Antidiabetic and GLUT4 gene Expression of *Acanthopanax senticosus* Extracts

Eui Su Choung, Jong Phil Bak, Han Choi¹, Gyeong Sun Jang², Shin Ho Kang³, Se Chan Kang^{3,*} and Ok Pyo Zee

College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea

¹Gyeong-gi Pharmaceutical Research Center, Suwon 443-766, Korea

²Ilsonjung Co., Ltd., Suwon 440-320, Korea

³Dept. of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 309-711, Korea

Abstract – Antidiabetic effects of an aqueous and solvent extract prepared from the root, stem and fruit parts of *Acanthopanax senticosus*, were investigated in experimental Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats model. The n-butanol and water extracts of *A. senticosus* were orally administrated once a day for 6 days. The n-butanol extracts of fruit (FB) showed highest efficiency than other groups (water extracts of stem, root and fruit; butanol extracts of stem, root) on serum glucose values in the STZ-induced diabetic rats. We have studied gene expression of glucose transporter genes in C2C12 skeletal muscle cell line during differentiation treated by the n-butanol and water extracts of *A. senticosus*, SW, RW, FW, SB, RB and FB. The GLUT4 gene was high expressed by FB treatment. These findings suggest that FB of *A. senticosus* have GLUT4 gene expression activity for glucose homeostasis and may have beneficial effects on blood glucose lowering in the diabetic patients.

Keywords – Streptozotocin, *Acanthopanax senticosus*, Antidiabetic effect, GLUT2, GLUT4

가시오가피 (*Acanthopanax Senticosus* Harms)는 한국, 일본, 중국 및 시베리아의 고지대에 자생하는 Araliaceae에 속하는 다년생 낙엽관목으로 전통적으로 다양한 질병에 이용되어 왔다. 가시오가피의 줄기와 뿌리껍질은 강장제 및 류마티스 관절염, 만성기관지염 등의 예방제로 이용되어 왔다.^{1,2)} 또한 동의보감, 한약집성방, 신농본초경 및 본초강목 등의 고전 한의서에 오가피의 약리효능이 탁월하여 발산, 구풍작용 등의 대사촉진제 및 음위, 강장, 강정, 진경, 향통증 등에 유효한 약물로 알려져 왔다.^{3,4)} 가시오가피의 줄기 및 뿌리껍질외에도 잎은 항스트레스제로 이용된 바 있으며, 최근에는 과실의 이용에도 많은 관심이 증대되고 있다.⁵⁾

한편, 전세계 인구의 3%가 당뇨병으로 고통받고 있으며, 국내 당뇨병 및 합병증으로 인한 사망률이 전체 사인의 4위로 보고되고 있다.^{6,7)} 당뇨병은 유전적, 대사적, 환경적인 요인에 의해 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비 감소 또는

말초 조직의 인슐린 저항에 의한 고혈당이 나타나며, 특히 생체내 활성산소의 과도한 생성으로 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴 등의 세포 기능저하와 세포괴사에 의하여 발병한다.^{8,9,10)}

당뇨병은 췌장의 베타세포 감소에 의한 인슐린 분비 감소로 인한 제1형 당뇨병과 인슐린 분비기능과 인슐린 저항성이 억제된 제2형 당뇨병으로 나뉠 수 있다.¹¹⁾ 혈중 포도당의 항상성은 생체기관의 다양한 작용의 결과로 유지된다. 고혈당의 결과로 혈중 포도당은 glucose transporter 2 (GLUT2)를 통하여 수송되어 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비가 개시되도록 한다.¹²⁾ 이와 반대로, 분비된 인슐린은 근육과 지방조직으로 glucose transporter 4 (GLUT4)를 통하여 혈중 포도당이 유입되도록 한다.¹³⁾

당뇨병의 치료는 대부분 약물치료와 식이요법에 의존하고 있어 약물복용에 따른 독성문제와 환자의 내성문제가 대두되고 있다. 따라서, 최근에는 천연물질에서의 약리물질을 탐색하는 연구가 이루어지고 있으며, 당뇨병 치료에 효과

*교신저자 (E-mail): sckang@semyung.ac.kr
(FAX): 043-649-1729

가 있다고 보고된 전통식물은 전 세계적으로 약 400여종 이상으로 추정된다.¹⁴⁾ 또한, 최근 가시오가피의 뿌리추출물이 당뇨유발 동물모델에서 인슐린 저항성을 증대시킨다는 보고를 비롯하여 가시오가피의 항당뇨 활성에 대한 연구가 보고된 바 있으며, 국내산 가시오가피의 chilsanoside의 혈당저하 효과가 보고된 바 있다.^{15,16)}

본 연구에서는 국내산 가시오가피의 뿌리, 줄기, 과실 추출물의 Streptozotocin 유도 당뇨모델에서의 혈당강하 효과를 확인하였으며, 각 부위별 추출물의 포도당 수송에 관여하는 단백질인 GLUT2와 GLUT4의 유전자 발현 평가를 통하여 GLUT4의 발현증가를 통한 말초조직에서의 포도당 수송에 도움이 되는 가시오가피의 부위별 추출물을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서는 (주)일송정(수원)으로부터 구입한 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*)를 정확히 감별하여 사용하였으며, 가시오가피 뿌리, 줄기, 과실을 건조시킨 후 분쇄하여 50% 아세톤 수용액으로 60°C에서 2시간 환류 추출하였다. 여과후40에서 감압농축하여 아세톤 성분을 제거하고 수상만 남도록 하였다. 동량의 부탄올을 가하여 액액분리한 후, 부탄올 층을 감압농축하였다. 잔류 부탄올을 제거하기 위하여 물을 첨가하여 용매를 제거하였으며 완전 건조 후, 50% 에탄올 수용액에 용해하여 재건조 한 후 잔류 부탄올을 완전히 제거하여 시험에 사용하였다 (Fig. 1).

실험동물 - 본 실험에서 사용된 실험 동물은 (주)중앙동물 실험에서 구입한 200 g 전후의 Spargue-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 사료는 삼양유지(주)의 소동물용 고품사료를 사용하였으며, 물은 상수를 사용하여 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 1주간 순화시킨 후 사용하였다. 실험기간 중 사육실 환경조건은 실내온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 환기회수 10-18 회/hr 으로 하였으며, timer를 이용하여 12 시간씩 명암을 주기적으로 교환하였고, 조도는 300-500 Lux 로 하였다.

Streptozotocin (STZ) 유도 당뇨 모델 - 체중 200 g 내외의 Spargue-Dawley계 웅성 흰쥐를 1주일간 순화시킨 후 STZ를 60 mg/kg, b.w 용량으로 0.01 M citric acid 에 녹여 2 mL/kg, b.w 용량으로 복강주사 하였다. 정상군, 당뇨 유발 대조군 (Vehicle)과 비교하기 위하여 가시오가피 추출물을 뿌리, 줄기, 과실의 물추출물 (RW, SW, FW)과 뿌리, 줄기, 과실의 부탄올 추출물 (RB, SB, FB)을 평균체중에 맞추어 100mg/kg, b.w 용량으로 1일 1회 6일간 경구투여하였다. STZ유도군 (Vehicle), 정상군, 가시오가피 추출물 투여군을 최종 투여 후 24시간 후에 ether 마취하에 개복하여 복부 대동맥으로부터 채혈한 후 원심분리하여 혈청을 취하여 생화학분석에 이용하였다. 복부대동맥에서 채취된 혈액을 혈청분리관 (RM603PS, Iatron Co., 일본)을 이용하여 혈액을 실온에서 응고시킨 후, 냉장고속원심분리기 (Avanti 30, Beckman Co., 미국)를 사용하여 5,000 rpm에 10분간 원심분리하였다. 분리된 혈청은 deep freezer (-70°C)에 보관하였으며, 생화학 자동분석기 (Advia 1650, Jeol Co., 일본)를 사용하여 혈중 GLU 함량을 측정하였다.

세포배양 및 GLUT 유전자 발현 측정 - GLUT2 및 GLUT4유전자의 발현을 평가하기 위하여 C2C12 myoblast 세포를 horse serum 자극에 의하여 근육세포로 분화하여 인슐린 자극에 의한 포도당의 유입을 조절하는 GLUT2 및 GLUT4 유전자를 Real time PCR로 평가하였다. C2C12세포를 dextran-charcoaled FBS를 첨가한 GM 배지에 37, 5% CO₂ 조건하에서 2×10⁴ cells/ml 개 분주하고, 72시간 배양한 후 세포의 수가 약 80% T75 flask에 채워졌을 때, 2% horse serum이 첨가된 DMEM배지로 교환하여 근육세포로 분화하였다.¹⁷⁾ 근육세포로 분화시 가시오가피 추출물을 각각 50 μg/ml을 처리하여 24시간 배양한 후 PBS로 세척하여 1ml TRIZOL™ (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 분리하였다. Real time PCR은 DNA Master Cyber Green (Roche, CA, USA)를 이용하여 MyIQ iCycler (Bio-Rad, CA, USA)에서 실시하였다. GLUT2 및 GLUT4의 primer는 Forward: 5'-TTAGCAACTGGGTCTGCAAT-3'; Reverse: 5'-GGTGTAGTCCTACACTCATG-3'과 Forward: 5'-

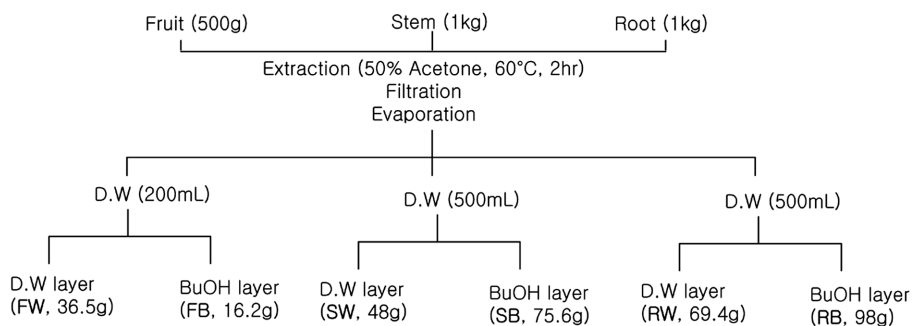


Fig. 1. Extraction and Fractionation of *Acanthopanax senticosus*.

ATGTGTGGCTGTGCCATCTT-3'; Reverse: 5'GGTTTCACCTCTGCTCTAA-3' 이용하였으며, 95°C에서 60초간 pre-running 후, 95°C에서 10초, 56°C에서 15초, 72°C에서 20초, 82에서 6초의 간격으로 40회 반복하여 증폭하였다.¹⁸⁾

통계학적 분석 - 모든 시험결과는 평균권±표준오차로 나타내었으며, 대조군과 투여군 사이의 통계학적 유의성은 Dunnett's test를 이용하여 P<0.05, P<0.01 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 STZ유도 당뇨모델에서 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*) 부위별 추출물의 혈당강하 효과 및 GLUT2 및 GLUT4 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 가시오가피 뿌리 1 kg, 줄기 1 kg, 과실 500 g을 각각 음건/세절하여 50% 아세톤 수용액으로 추출하여 물층과 부탄올 층으로 구분하여 분말화하여 STZ 유도 당뇨모델 평가 및 GLUT 유전자 발현 분석에 이용하였다 (Fig. 1). STZ로 유도한 당뇨모델에서 STZ로 유도된 음성 흰쥐를 음성대조군 (V, vehicle)으로 하고, 가시오가피 부위별 추출물 (뿌리, 줄기, 과실 물층 : RW, SW, FW 및 뿌리, 줄기, 과실 부탄올층 : RB, SB, FB)을 100mg/kg b.w를 경구투여 한 실험군을 정상대조군 (Con)과 비교하였다. STZ로 유도하지 않은 정상군 (Con)의 혈당은 105.4 ± 22.51 이었으며, 60 mg/kg STZ 복강투여로 인한 당뇨유발 음성흰

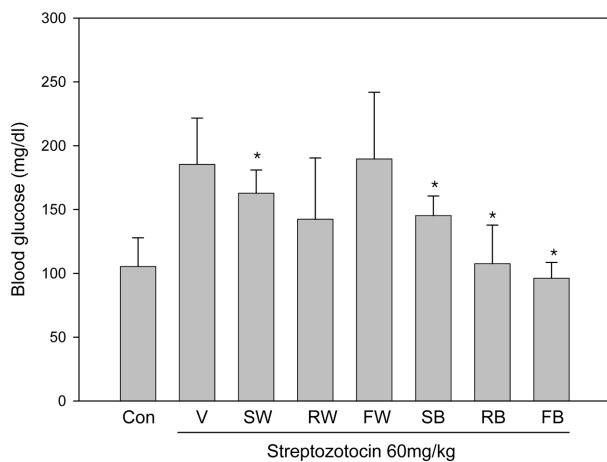


Fig. 2. Effects of *Acanthopanax senticosus* extracts on serum glucose in the STZ-induced diabetic rats. Data represent the means±S.D. (n=6). Values significantly different from the controls group (V) are indicated (*) at P<0.05 and (**) at P<0.01. SW: water layer of stem, RW: water layer of Root, FW: water layer of Fruit, SB: butanol layer of stem, RB: butanol layer of root, FB: butanol layer of Fruit.

쥐 (V, vehicle)는 185±36.21인데 반하여, 줄기 물층 (SW)은 통계적으로 유의성 있게 (P<0.05) 혈당저하 효과를 나타내었으며, 뿌리 물층(RW) 또한 통계적으로 유의성은 없었으나 혈당저하 효과를 나타내었다. 반면, 가시오가피 뿌리, 줄기, 과실의 부탄올 층 (SB, RB, FB)은 모두 통계적으로 유의성 있게 혈당저하 효과를 나타내었다. 특히, 가시오가피 과실 부탄올 추출물 (FB)는 96.2±12.33으로 STZ로 유도하지 않은 정상군(Con)까지 혈당수치가 회복되었다 (Fig. 2).

가시오가피 추출물의 혈중 포도당의 조절 기능을 규명하기 위하여 C2C12 myoblast 세포주로부터 2%의 horse serum이 첨가된 DMEM 배지로 근육세포로 분화유도 후, GLUT2와 GLUT4 유전자의 발현을 측정하였다. 고혈당의 결과로 혈중 포도당은 GLUT2를 통하여 수송되어 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비가 개시되도록 하며, 분비된 인슐린은 GLUT4를 통하여 혈중 포도당이 근육세포로 유입되도록 한다.^{12, 13)} 따라서, 가시오가피 추출물이 STZ유도 모델에서 나타난 바와 같이 혈중 포도당을 조절하므로 혈중 포도당과 glucose transporter (GLUT) 유전자 발현과의 관계를 규명하기 위하여 근육세포로 분화된 C2C12세포주에 가시오가피 부위별 추출물을 처리하여 GLUT유전자의 발현을 Real time PCR로 측정하였다.

가시오가피 부위별 각각의 추출물을 50 µg/ml 처리시, GLUT2 유전자는 가시오가피 과실 물추출물 (FW)외에 다른 부위의 물 및 부탄올 추출물에서는 발현에 변화가 없었으며, FW 처리시 가시오가피 추출물을 처리하지 않은 정상군의 세포 (Con)에 비해 GLUT2 유전자 발현이 약 4배 이상 증가하였다. 이와 같은 결과는 가시오가피 과실 물 추출물

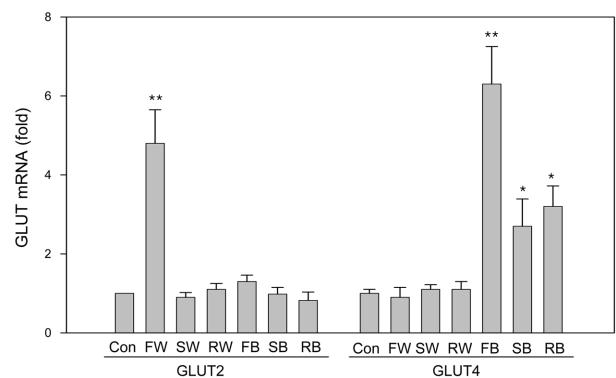


Fig. 3. mRNA expression of glucose transporter genes by *Acanthopanax senticosus* extracts treatment during C2C12 skeletal muscle cell line differentiation. Data represent the means±S.D. (n=3). Values significantly different from the controls group (Con) are indicated (*) at P<0.05 and (**) at P<0.01. SW: water layer of stem, RW: water layer of Root, FW: water layer of Fruit, SB: butanol layer of stem, RB: butanol layer of root, FB: butanol layer of Fruit. GLUT2: glucose transporter 2, GLUT4: glucose transporter 4.

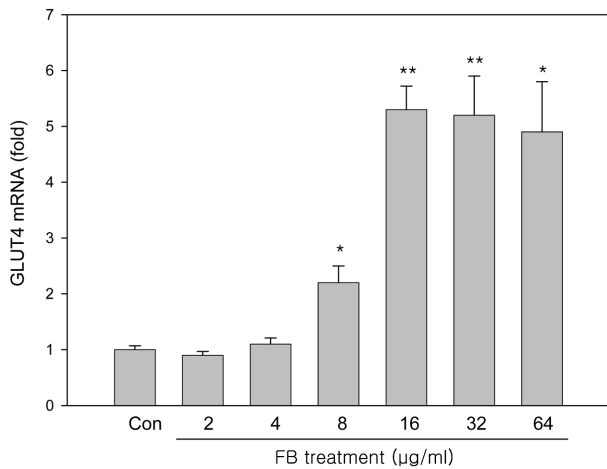


Fig. 4. mRNA expression of glucose transporter 4 (GLUT4) gene treated by butanol layer of *Acanthopanax senticosus* fruit (FB) in skeletal muscle differentiated C2C12 myoblast cell line. Data represent the means±S.D. (n=3). Values significantly different from the controls group (Con) are indicated (*) at $P<0.05$ and (**) at $P<0.01$.

에 함유되어 있는 포도당 및 포도당과 유사한 다양한 당에 의하여 GLUT2 발현이 유도된 것으로 생각되었다. 근육세포로의 포도당 수송에 관여하는 GLUT4 유전자 발현에서는 가시오가피의 모든 부위의 물추출물 (FW, SW, RW)에서 유전자 발현에 미치는 영향이 관찰되지 않았으나, 부탄올 추출물 (FB, SB, RB)에서 GLUT4 유전자가 가시오가피를 처리하지 않은 정상의 세포 (Con)에 비하여 약 2.5~6배까지 발현이 증가되었다. 특히, 가시오가피 과실 부탄올 추출물 (FB)에서 GLUT4 유전자가 6배 이상 증가됨을 확인하였다. 따라서, 가시오가피 과실 부탄올 추출물 (FB)은 GLUT4 유전자 발현을 증가시킴으로써 혈중 포도당의 근육세포로의 유입을 증가시켜 혈당저하 효과를 나타낼 것으로 생각된다 (Fig. 3).

가시오가피 과실의 부탄올 추출물 (FB)의 GLUT4 유전자 발현을 정확하게 측정하기 위하여 FB추출물 0, 2, 4, 8, 16, 32 및 64 µg/ml을 처리하여 GLUT4 유전자의 발현을 재평가 하였다. 그 결과, 8 µg/ml 이상의 FB 추출물 처리시 약 2~5.5배의 GLUT4 유전자 발현 증가가 나타났다 (Fig. 4).

당뇨병의 요인과 치료기전은 다양하며 특히, 체내의 포도당 항상성과 말초조직내의 포도당 유입은 인슐린의 다양한 활성 중 세포막의 GLUT4 유전자의 발현과 위치변화 조절이 가장 큰 역할의 결과로 나타난다. 정상적인 상태에서 GLUT4는 세포막에 위치하여 생체조절에 하나 이상의 다양한 조절기능을 수행하고 있으며, 인슐린에 의하여 활성화되었을 때 GLUT4의 발현은 급격하게 증가하여 말초조직으로 분비된다. 고혈당 조건에서 인슐린에 의해 활성화된 GLUT4는 말초조직으로의 포도당 유입을 증가시켜 체내의

포도당 항상성을 유지하는 주요한 역할을 하고 있다.¹⁹⁾ 본 연구의 결과 가시오가피 과실의 부탄올 추출물에 의하여 GLUT4의 발현이 증가하므로 가시오가피 과실 부탄올 추출물은 인슐린에 의한 GLUT4 발현 및 활성조절에 관여하는 PI3-kinase, Akt 등 다양한 세포신호전달자와 함께 GLUT4의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.^{14, 19)}

본 연구의 결과, 가시오가피 추출물은 STZ유도 당뇨모델에서 특히, 부탄올 추출물이 혈당강하 효과가 있는 것으로 생각되며, 가시오가피의 다양한 부위 중 과실의 부탄올 추출물은 STZ유도 당뇨모델에서의 혈당강하 효과와 더불어 GLUT4 발현을 조절함으로써 체내의 포도당 항상성 유지에 도움을 줌으로써 당뇨병의 예방과 치료제 역할을 할 것으로 기대된다. 본 연구의 결과는 STZ유도 당뇨모델과 C2C12로부터 근세포로 분화된 *in vitro* 조건에서 시험된 결과이나, 향후 가시오가피 과실의 부탄올 추출물로부터 유효성분을 규명하고, GLUT4 활성조절에 미치는 영향을 다양한 세포 및 동물시험에서 규명한다면, 생약자원으로부터의 당뇨병 치료제 개발에 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구에 사용된 시료는 (주)일송정 (수원) 으로 공급부터 되었으며, 가시오가피 당뇨 시험과 관련하여 조언과 시료공급에 도움을 주신 (주)일송정 대표이사 및 장내과 의원 대표원장 장경순 원장님께 감사 드립니다.

인용문헌

1. Tian, B.J., Gao, T.L. and Song, Z.L. (1989) Effects of Ciwujia (*Acanthopanax senticosus* Harms) on reperfusion-induced arrhythmia and action potential alterations in the isolated rat heart. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **14**: 493-495.
2. Nishibe, S., Kinoshita, H., Takeda, H. and Okano, G. (1990) Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 1763-1765.
3. Lee, Y.S., Jung, S.H., Lim, S.S., Lee, S.H. and Shin K.H. (2001) Effects of the water extract from the stem bark of *Acanthopanax senticosus* on hyperlipidemia in rats. *Korean J. Pharmacogn.* **32**: 103-107.
4. Kim, S.K., Kim, Y.G., Lee, M.K., Han J.S., Lee, J.H. and Lee, H.Y. (2000) Comparison of biological activity according to extracting solvents of four acanthopanax root bark. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **8**: 21-28.
5. Li, X.Y. (1991) Immunomodulating Chinese herbal medicines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **86**: 159-164.
6. Korea national statistical office (2003) The cause of death statistics.

7. Anoja, S.A. (2002) Antidiabetic effect of *Panax ginseng* Berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes* **51**: 1858.
8. Narle, A., Krall, L.P., Bradley, R.F., Christlieb, A.R. and Soell, J.S. (1985) *Joslin's Diabetes mellitus 12th ed.*, Lea & Febiger, Philadelphia.
9. Moody, C.S and Hassan, H.M. (1982) Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 2855-2859.
10. Junquera, V.B.C., Simiz, K., Videla, L.A. and Barros, S.B. (1996) Dose dependent study of the effects of acute in dams administration on rat liver superoxide anion production antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Toxicology* **41**: 193-204.
11. Pickup, J. and Williams, G. (2003) *Textbook of Diabetes*, Blackwell Science, Oxford, UK.
12. Wiederkehr, A. and Wollheim, C.B (2006) Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* **147**: 2643-2649.
13. Holman, G.D. and Kasuga, M. (1997) From receptor to transporter: insulin signaling to glucose transport. *Diabetologia* **40**: 991-1003.
14. Bailey C.J. and Day, C. (1989) Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetic Care* **12**: 553-564.
15. Liu, T.P, Lee, C.S., Liou, S.S., Liu I.M. and Cheung, J.T. (2005) Improvement of insulin resistance by *Acanthopanax senticosus* root in fructose-rich chow-fed rats. *Clin. Experi. Pharmacol. Physiol.* **32**: 649-654.
16. Kim, C.J. and Hahn, D.R. (1980) The biological activity of a new glycoside, chiisanoside from *Acanthopanax chiisanensis* Nakai leaves. *Yakhak Hoeji* **24**: 123-134.
17. Wannenes, F., Caprio, M., Gatta, L., Fabbri, A., Bonini, S. and Moretti, C. (2008) Androgen receptor expression during C2C12 skeletal muscle cell line differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press).
18. Caisheng, L.U., Rengao, Y.E, Qiongqiong, Y., Xiao. Y., Huiqun L.I. and Youji L.I. (2001) Gene expression of glucose transporters and its regulation by glucose in mesothelial cells. *Chinese Medica. J.* **114**: 447-480.
19. Watson, R.T. and Pessin, J.E. (2001) Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog. Horm. Res.* **56**: 175-194.

(2008년 7월 29일 접수)