

구기자 추출물의 항비만 및 혈당강하 효과

황은영 · 홍정희 · 최준혁 · 이은정 · 이인선[†]

계명대학교 식품가공학 전공, 계명대학교 전통미생물 자원 개발 및 산업화 연구 센터

Study on Anti-obesity and Hypoglycemic Effects of *Lycium chinense* Mill Extracts

Eun-Young Hwang, Jung-Hee Hong, Jun-Hyeok Choi, Eun-Jung Lee, and In-Seon Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, The Center for Traditional Microorganism Resources,
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

This study was designed to evaluate the anti-obesity and hypoglycemic effects of Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts in 3T3-L1 adipocytes. We investigated the α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of extracts from Gugija. Gugija was extracted by 70% EtOH and 80% MeOH and aqueous, respectively. A single oral dose of Gugija extract inhibited the increase of blood glucose levels significantly at 0, 30, 60, 90 and 120 min and decreased incremental response areas under the glycemic response curve. These results suggest that Gugija 70% EtOH extracts may delay carbohydrate digestion and reduce postprandial hyperglycemia. In addition, triglyceride content in 3T3-L1 adipocytes decreased at higher concentrations of Gugija 70% EtOH extract. Free fatty acid content in 3T3-L1 adipocytes was increased at higher concentrations of Gugija 70% EtOH extract. Also, glucose transporter 4 (GLUT4), the key insulin signaling pathway transcription factor, was remarkably increased by the Gugija 70% EtOH extract when compared to those of control cells in protein expression levels. Therefore, Gugija can be developed as an effective anti-obesity and hypoglycemic agent.

Key words: Gugija (*Lycium chinense* Mill), anti-obesity, hypoglycemic, 3T3-L1 adipocyte, GLUT4

서 론

우리나라는 빠른 경제성장과 함께 소득수준의 향상, 식습관의 변화, 신체 활동량의 감소 등의 이유로 비만, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등의 성인병 발생율이 증가하고 있는 추세이다(1).

성인병 유발의 가장 기본적인 원인은 비만인데 2007년 의료정책연구소 발표에 의하면 우리나라 당뇨병사망자는 OECD 회원국의 평균인 13.5명보다 2.5배 높은 35.3명으로 회원국 중 가장 높은 수치를 기록하였고 우리나라에서 최근 10년 동안 제2형 당뇨병 환자의 수가 5배 이상 증가하여 전체 인구의 약 10%가 제2형 당뇨병 환자이고, 특히 40대와 50대에서 그 유병률이 급격히 상승하고 있으며(2,3), 앞으로도 계속 증가할 것으로 예상된다.

당뇨병은 그 발생 원인에 따라 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병으로 나누어진다. 제1형 당뇨병은 유전적인 결함이나 감염에 의해 췌장세포가 파괴되어 인슐린이 분비되지 않아 발생하며, 제2형 당뇨병은 비만으로 인해 인슐린이 정상적이거나 초과로 분비되지만 그 작용이 효과적으로 이루어지지

않아 발생하는 것으로 인슐린 저항성이 있다고 하며, 상대적 인 인슐린 결핍을 나타낸다(4). 비만의 일반적인 특징으로 나타나는 hyperinsulinemia는 과도한 지방조직의 축적, 특히 복부 비만에 의해 유발된 insulin resistance에 의해 나타난다. 이것은 insulin target cell인 지방세포에서 후수송체인 insulin receptor substrate-1(IRS-1)의 장애에 따른 insulin 신호 전달 체계 장애 결과, glucose transporter 4(GLUT4) 장애에 의해 고혈당이 초래되고, 이를 보상하기 위해 hyperinsulinemia가 초래되는 것으로 보고되었다(5,6).

이러한 특징을 가지는 제2형 당뇨병 치료를 위해 대표적으로 사용되는 혈당강하제인 acarbose는 복부팽만, 설사 등의 부작용을 동반한다. 따라서 천연물 중 이러한 부작용이 없으며, 제2형 당뇨병 합병증인 지방간 분해를 통한 간 보호 효과와 항고혈압 및 혈당강하 작용 등의 보고는 있으나, 제2형 당뇨병과 관련한 기전연구에 관한 논문이 없는 구기자를 선택하여 제2형 당뇨병에 미치는 기전을 알아보고자 하였다(7-11).

따라서 본 논문에서는 구기자 추출물의 탄수화물 소화관련 효소 작용 및 비만억제 효과를 알아보기 위해 3T3-L1

[†]Corresponding author. E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5538, Fax: 82-53-580-5538

adipocyte를 이용한 관련 기작 연구를 통하여 제2형 당뇨병 약제로서 구기자의 기능성 효과를 얻었기에 이를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료

구기자는 경상북도 성주군 추루면에서 채배되어 2007년 10월에 채취한 건조구기자를 사용하였으며, 저장은 4°C 냉장에서 보관하였다.

추출용매별 추출물

80% MeOH, 70% EtOH 추출물: 시료 추출에 사용된 용매인 methanol, ethanol은 J.T.Baker사(Mallinckrodt Baker Inc., Philipsburg, USA)의 특급시약을 사용하였고, 100 g의 건조된 구기자에 80% MeOH, 70% EtOH 1 L을 넣고 실온에서 24 hr 4회 반복 추출하여 여과한 뒤 감압 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

물추출물: 70~80°C의 물 1 L에 건조구기자 100 g을 넣고 1 hr 2회 반복 환류 추출을 실시한 후 여과하여 감압 농축하여 동결 건조하여 사용하였다.

탄수화물 소화관련 효소작용 저해능 측정

Salivary α -amylase(SAA)와 pancreas α -amylase(PAA)의 활성저해: 인간 타액 유래의 SAA와 돼지 췌장 유래의 PAA(Sigma, MO, USA)에 대한 저해활성은 starch(Sigma)를 기질로 하여 측정하였다. 효소액(0.5 unit)과 구기자의 추출물이나 SAA, PAA 및 비교로서 acarbose(Bayer, Leverkusen, German)을 50 mM-phosphatate buffer(pH 6.8)에 넣고, 37°C에서 20분간 혼합, 반응시킨 후 0.5% starch를 가하여 37°C에서 5분간 반응시키고, DNS발색시약을 넣어 반응을 정지시켰다. 이를 100°C에서 10분간 가열하여 발색을 시키고, 냉각 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α -Glucosidase(AG): 효모기원의 0.75 unit의 AG(Sigma)와 구기자추출물과 비교로서 acarbose를 기질인 3 mM p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside(Sigma)와 50 mM-phosphatate buffer(pH 6.8)에 혼합하여, 37°C에서 20분간 반응 후, 0.5 M Na₂CO₃를 가하여 반응을 정지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다.

내당능 측정

정상인 ICR mouse를 난피법으로 세 군으로 나누고, 동물을 24시간 동안 절식시킨 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 간이혈당계로 측정하였다. 대조군(n=3)은 soluble starch(1 g/kg, Sigma Co.)를, 실험군은 soluble starch(1 g/kg)와 70% EtOH 구기자 추출물(100, 200 mg/kg)을 경구투여 하였다. 투여 후 30, 60, 90, 120분에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당

증가곡선을 구하였다.

지방분해능 측정

세포배양 및 지방세포로의 분화 유도: 실험에 사용한 3T3-L1 섬유아세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 배양 및 분화배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL, CA, USA) high glucose, 10% Calf serum, antibiotics, trypsin-EDTA는 Gibco BRL(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 5% CO₂ 습도, 37°C incubator에서 계대배양 하였다. 분화배양배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL) high glucose, 10% fetal bovine serum(FBS), antibiotics, trypsin-EDTA는 Gibco BRL로부터 구입하여 5% CO₂ 습도, 37°C incubator에서 3~4일 후 세포가 융합하게 되면 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 분리하여 원심분리기(1000 rpm, 5분)에서 세포를 모은 후, 세포 밀도가 2×10⁶ cell/cm²인 suspension용액을 만들어 100 ϕ dish에 1 mL씩 plating하여 배양하였다. 4일 후 융합된 세포를 분화배지(DMEM 배양액에 23 mg/mL IBMX, 5 mg/mL의 insulin, 1 mM dexamethazone가 첨가된 배지)를 처리하여 분화가 시작되게 하였다. 이를 후 feeding medium(DMEM 배양액에 5 mg/mL의 insulin만 포함된 배지)으로 배지를 갈아준 후, 2일에 한 번씩 계속 feeding medium으로 갈아주며 세포를 분화시켰다.

세포 생존율 측정(MTT assay)

시료에 대한 세포 생존율은 MTT{3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} colorimetric assay 방법으로 실험하였다(12). 세포는 1×10⁵ cell/200 μ L의 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 DMEM 배지 200 μ L에 농도별로 희석한 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양한 다음 2.5 mg/mL로 제조한 MTT용액 20 μ L를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 세포 생존율은 다음과 같이 계산하여 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \{100 - (\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}\} \times 100$$

Leptin 측정

Cell을 lysis시킨 후 4°C에서 14000 rpm로 10분간 원심분리 하여 그 상등액을 가지고 ELISA(enzyme linked immunosolvent assay) 방법을 이용하여 측정하였다. Goat anti-mouse leptin IgG 2 μ g/mL를 Maxisorb ELISA plate(Nunc)에 넣어 overnight 배양한 후 PBS-T(0.05%의 Tween 20을 포함하는 PBS)로 3차례 세척한 plate에 시료 100 μ L을 넣어 1시간 동안 배양하였다. 다시 PBS-T로 3차

레 세척한 후 biotinylated goat anti-mouse leptin IgG 200 µg/mL을 넣고 1시간 동안 상온에서 incubation한 후 다시 PBS-T로 3번 세척하였다. Extravidin-horse radish peroxidase를 상온에서 1시간 동안 배양한 후 3번 세척하였다. Immunoreactivity는 각 well에 100 µL의 tetramethylbenzidine dihydrochloride substrate(TMB)를 넣고 30분 동안 반응시킨 후 나타난다. 이 반응은 well 당 50 µL의 2 M H₂SO₄를 첨가함으로써 반응을 종료시켰다. 반응 종료 후 흡광도는 450 nm에서 측정하였다.

중성지방 측정

Cell을 lysis시킨 후 4°C에서 14000 rpm로 10분간 원심분리 하여 그 상등액 0.02 mL와 중성지방 표준용액에 조제한 반응시약(AM 157S-K 1 vial을 효소시약 용해액 1병에 용해) 3 mL씩을 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 중성지방 농도를 계산하였다. 혈장 중성지방 농도는 효소법(13)에 의한 정량용 중성지방 kit(Triglyceride AM 157S-K, 아산제약, 서울, 한국)로 측정하였다.

$$\text{Triglyceride (mg/dL)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 300$$

유리지방산 측정

지방세포에서 분비된 유리지방산의 양은 혈청유리지방산 측정용 시약(SICDIA NFFAZYME, Shin Young Chemical IND. Co., LTD, Korea) 이용하여 농도별로 첨가한 배지 5 µL와 NEFA시약-1A 200 µL 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 NEFA시약-1B 100 µL 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Free fatty acid (mg/dL)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 1000$$

Western-blotting 법에 의한 유전자 발현 조사

3T3-L1 cell을 dish(100 mm)에 2×10⁶ cells/well로 배양, 분화시킨 뒤 cell에 lysis buffer(1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM PMSF)를 첨가하여 lysis시킨 후 BCA(Bicinchoninic acid) kit로 단백질을 정량하였다. 단백질 농도를 µg으로 조정하여 10% SDS-polyacrylamide에 loading하여 125 V로 전기영동 하였다. 전기영동 하여 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane을 사용하여 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA로 transfer시키고 5% non-fat skim milk solution으로 blocking한 후 1차 항체 GLUT4, β-actin(Santa Cruz, CA, USA)와 2차 항체 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG(Cell signaling, MA, USA)를 붙였다. 항체 반응이 끝난 membrane에 ECL detection kit로 처리하고 X-ray film에 노출하여 현상한 후

Table 1. Yield (%) of Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts

Yield (%) ¹⁾		
80% MeOH	70% EtOH	Aqueous
19	13.37	43.76

¹⁾Percentage of extract content per 100 g of Gugija (*Lycium chinense* Mill) solids when extracted with methanol, ethanol and water.

band를 확인하였다.

결과 및 고찰

용매별 구기자 추출물의 수율

건조된 구기자를 80% MeOH, 70% EtOH, 열수로 추출하였다. 이들을 추출용매에 대해 차지하는 비율로 환산하면 19%, 13.37%, 43.73%로 열수추출물의 수율이 가장 높았다 (Table 1).

탄수화물 소화관련 효소 저해 효과

용매별 구기자 추출물에 따른 salivary α-amylase (SAA)와 pancreas α-amylase(PAA)에 대한 활성저해 효과: 타액 및 췌장에서 분비되는 SAA와 PAA에 대한 추출용매별 저해 효과를 비교하기 위해 80% MeOH, 70% EtOH, 열수 용매에 따른 구기자 추출물을 통해 적정 비교가능 농도로 일정하게 희석한 후 활성저해 효과를 비교하였다(Table 2). 이때 대표적인 혈당강하제로 시판되고 있는 acarbose와 비교한 결과, 추출물 모두 SAA와 PAA에서 IC₅₀값이 acarbose보다 2배 이상 낮은 값을 나타냈으며, 추출물의 SAA 저해 활성의 경우 80% MeOH 및 70% EtOH이 가장 우수한 효과를 나타냈으며, 두 용매간의 유의적인 차이는 없었다. 추출물의 PAA 저해 활성은 70% EtOH에서 가장 우수하였다.

용매별 구기자 추출물에 따른 α-glucosidase(AG)에 대한 활성저해 효과: 식이 중의 전분은 소장에서 AG에 의해 분해, 흡수되어 식후 혈당치를 증가시키므로, *in vitro*에서 AG 저해활성을 나타낸 구기자 추출물이 혈당강하제로서의 가능성을 검정하였다.

추출용매별 AG에 대한 저해 효과를 비교하기 위해 80%

Table 2. α-Amylase inhibitory activities of Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts

	Saliva α-amylase IC ₅₀ (mg/mL) ¹⁾	Pancreas α-amylase IC ₅₀ (mg/mL)
Acarbose	7.04±0.35 ^a	10.97±0.22 ^b
80%MeOH	3.19±0.03 ^c	4.16±0.18 ^d
70%EtOH	3.20±0.07 ^c	3.07±0.10 ^c
Aqueous	3.66±0.01 ^d	3.55±0.06 ^a

¹⁾IC₅₀ value is the concentration of sample required for 50% inhibition. Each value is expressed as mean±SD in triplicate experiments.

Mean values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05).

Table 3. α-Glucosidase¹⁾ inhibitory activities of Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts

	IC ₅₀ (μg/mL) ²⁾
Acarbose	5.05 ± 0.01 ^a
80% MeOH	5.01 ± 0.01 ^b
70% EtOH	4.98 ± 0.02 ^{bc}
Aqueous	4.80 ± 0.00 ^c

¹⁾α-Glucosidase: Concentration of acarbose and *Lycii Fructus* 10 μg/mL.

²⁾IC₅₀ value is the concentration of sample required for 50% inhibition. Each value is expressed as mean ± SD in triplicate experiments.

Mean values with different superscripts in the same row are significantly different (p < 0.05).

MeOH, 70% EtOH, 열수용매에 따른 구기자 추출물을 통해 적정 비교가능 농도로 일정하게 희석한 후 활성저해 효과를 비교하였다(Table 3). 이때 대표적인 혈당강하제로 시판되고 있는 acarbose와 비교한 결과, 추출물의 저해활성이 acarbose보다 우수함을 알 수 있었다. 천연물의 AG 저해활성을 탐색하여 혈당조절용 제품으로 개발하고자 하는 많은 연구들이 이루어졌다. Mai 등(14)은 산채류(허브, 녹색채소 등)의 polyphenol 성분이 높은 methanol 추출물에서 AG 저해활성이 높다고 보고하여, 항당뇨 제품으로 개발될 수 있는 가능성을 제시하였다. 뽕나무 잎 및 뿌리(15,16), 상백피(17) 등에서 AG 저해제가 분리되었다. 본 연구에서 *in vitro* 상에서 구기자 추출물의 AG 저해활성이 acarbose보다 우수함을 관찰하였으므로 이에 관련된 물질을 분리 정제하여 사용하면 약물치료로 인한 부작용을 예방할 수 있어 그 활용가치가 좋을 것으로 기대된다.

70% EtOH 구기자 추출물의 혈당 억제효과: 탄수화물 소화 관련 효소 저해효과를 *in vitro*에서 관찰한 결과, 70% EtOH 추출물이 우수한 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 70% EtOH 추출물을 이용하여 경구포도당 내당능 검사(oral glucose tolerance test)를 실시하였다.

공복 시 대조군과 실험군 모두 정상범위(150~200 mg/dL)로 시작하여 포도당 투여 후 30분일 때 대조군 333 mg/dL, 100 mg/kg 70% EtOH 추출물 270 mg/dL, 200 mg/kg 70% EtOH 추출물 200 mg/dL으로 감소하여 대조군 및 실험군 모두 120분 측정 시 다시 정상으로 떨어짐을 관찰하였다. 이때 100 mg보다 200 mg에서 기울기가 완만하게 감소함을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 효과는 구기자 성분 중 rutin, ascorbic acid, uracil의 혈당강하효과에 대한 보고를 통해 α-amylase와 α-glucosidase 저해활성을 돕는 것으로 사료된다(8,18,19). 당뇨병 예방 및 치료에 있어서 식후 혈당을 정상치에 가깝게 조절하는 것이 매우 중요하므로(20,21), 구기자는 당뇨병의 예방 및 치료에 있어서 유용한 식품으로 기대된다.

70% EtOH 구기자 추출물에 대한 3T3-L1 adipocyte에 대한 항비만 효과

70% EtOH 구기자 추출물에 대한 3T3-L1 adipocyte의

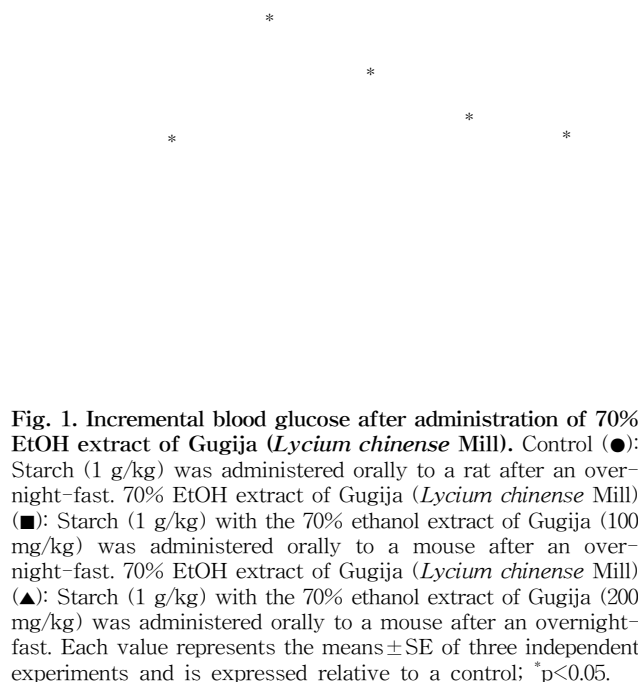


Fig. 1. Incremental blood glucose after administration of 70% EtOH extract of Gugija (*Lycium chinense* Mill). Control (●): Starch (1 g/kg) was administered orally to a rat after an overnight-fast. 70% EtOH extract of Gugija (*Lycium chinense* Mill) (■): Starch (1 g/kg) with the 70% ethanol extract of Gugija (100 mg/kg) was administered orally to a mouse after an overnight-fast. 70% EtOH extract of Gugija (*Lycium chinense* Mill) (▲): Starch (1 g/kg) with the 70% ethanol extract of Gugija (200 mg/kg) was administered orally to a mouse after an overnight-fast. Each value represents the means ± SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; *p < 0.05.

생존률: 세포 수준의 연구에 많이 이용되고 있는 MTT assay는 cell proliferation과 viability의 *in vitro* 분석에 매우 유용하게 사용되고 있으며(22), 3T3-L1 adipocyte를 이용한 70% EtOH 추출물을 농도별로 처리하여 일정시간 배양하였을 때 농도 2 mg/mL까지 90%이상의 높은 생존률이 나타났다(Fig. 2). 이는 70% EtOH 조릿대 잎 추출물(23)과 비교하였을 때 0.5 mg/mL에서 100% 가까운 생존률을 나타냈으나 5 mg/mL에서 23%로 현저히 떨어지는 결과가 나타났으므로 70% EtOH 구기자추출물의 3T3-L1 adipocyte에 대한 생존률이 높으며 독성이 낮아 기능성식품으로써 섭취할 수

Fig. 2. Effects of 70% EtOH Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts on the growth of 3T3-L1 adipocytes. Each value represents the means ± SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; *p < 0.05.



Fig. 3. Inhibition of leptin by 70% EtOH Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts in 3T3-L1 adipocytes. Each value represents the means \pm SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; ** p <0.01.

있는 가치가 있다고 사료된다.

Leptin: Dexamethasone을 포함한 다양한 종류의 스테로이드를 처리한 지방세포에서 leptin의 발현을 증가시킨다고 하였으며, insulin이 leptin 유전자의 발현을 증가시킨다고 하였다(8,24-28).

Leptin은 지방세포의 비만 유전자에 의해 생성되는 호르몬으로 시상하부에 작용하여 음식섭취를 억제시키고 에너지 소비를 증가시켜 비만을 조절하는 단백질로 지방세포내 지방축적량이 높을수록 leptin의 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있어 혈중 leptin 농도는 체지방량을 나타내는 지표로 비만연구에 많이 사용되고 있다(29,30). 70% EtOH 구기자 추출물 첨가에 의한 3T3-L1 adipocyte에서 분비된 leptin의 농도는 대조군에 비해 농도가 증가함에 따라 감소하였다(Fig. 3). 그중 청양고추와 고추장 추출물(31)에서 동일한 방법으로 leptin을 측정 한 연구에서 1 mg/mL 농도에서 대조군에 비해 각각 25%, 28% 감소하였는데 70% EtOH 구기자 추출물 1 mg/mL 농도에도 대조군에 비해 28% 감소하였다. 따라서 대조군에 비해 70% EtOH 구기자 추출물을 농도 의존적으로 처리함에 따라 leptin 함량이 감소하였으므로 70% EtOH 구기자 추출물이 지방 축적을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

중성지방: 구기자 추출물의 중성지방 강하 효과를 검증하기 위하여 분화시킨 3T3-L1 adipocyte에 농도별로 첨가한 후 3T3-L1 adipocyte의 0.5 및 1 mg/mL에서는 유의적인 효과가 없었으나, 2 mg/mL의 농도에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 본 실험과 동일한 방법으로 홍국, 홍국메밀, 돼지감자(32,33) 추출물에서 중성지방을 측정 한 결과에서 홍국과 홍국메밀에서는 대조군에 비해 2 mg/mL 농도에서 54%, 70% 감소하였고 돼지감자에서는 유의적으로 감소하지 않았지만 돼지감자의 성분 중 inulin 첨가 군에서는 유의적으로 감소함을 나타냈다. Leptin 수준과 triglyceride 축적

Fig. 4. Inhibition of triglyceride production by 70% EtOH Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts in 3T3-L1 adipocytes. Each value represents the means \pm SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; * p <0.05.

및 지방조직의 양과 밀접한 관련이 있으므로(35,36), 구기자가 홍국과 홍국메밀에 비해 중성지방 감소율은 낮지만 leptin 감소를 통해 지방축적을 억제시키는 효과가 있다.

유리지방산: 중성지방은 분해되면 글리세롤과 유리지방산으로 나누어진다. 70% EtOH 구기자 추출물의 비만 억제 효과를 알아보기 위하여 3T3-L1 adipocyte의 분해 효과를 살펴보았을 때 지방분해시 생성되는 배지내의 0.5, 1 mg/mL에서는 감소하였으나 2 mg/mL에서는 유의적으로 증가하였다(Fig. 5). 따라서 70% EtOH 구기자 추출물은 지방세포에 지방이 축적되는 것을 억제함으로써 비만을 억제하는 것으로 판단된다. 구기자 성분 중 zeaxantin, betaine이 지방간 분해에 효과가 있다고 보고가 되었고(30,36,37) 70% EtOH 구기자 추출물이 이들 물질을 포함하였을 가능성이 있다고 사료되며 그 결과 leptin 및 중성지방 농도 감소에 따른 배지내 유리지방산이 증가되었다고 판단되나 추후 검정이 필요한 실정이다.



Fig. 5. Changes in FFA contents by 70% EtOH Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts in 3T3-L1 adipocytes. Each value represents the means \pm SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; * p <0.05.

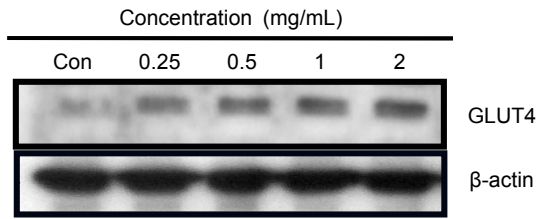


Fig. 6. Effects of 70% EtOH Gugija (*Lycium chinense* Mill) extracts on glucose transporter 4 (GLUT4) protein expression in 3T3-L1 adipocytes. Spot densitometry using image analyzing system was performed to determine the protein expression level of GLUT4. Each value is expressed as mean±SD in triplicate experiments.

GLUT4 단백질 발현

인슐린을 처리하면 3T3-L1 adipocyte의 세포막에 인슐린 이 insulin receptor(IR)와 결합하고 이것은 일련의 인슐린 신호전달체계인 insulin receptor substrate-1(IRS-1)-phosphatidyl inositol-3-phosphate(PI3 kinase)-Akt의 과정을 증폭시킨다(38). 실질적으로 혈액 내 포도당을 세포 내로 이동시키는 glucose transporter 4(GLUT4)의 발현에 영향을 주는 것으로 인슐린 신호전달체계에 중요한 역할을 한다(39,40).

70% EtOH 구기자 추출물이 혈액 내 포도당을 세포내로 이동시키는 역할을 하는 GLUT4에 미치는 영향을 확인하여 보았다. 그 결과 70% EtOH 구기자 추출물의 농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 증가함을 확인하였다(Fig. 6). 따라서 70% EtOH 구기자 추출물은 탄수화물 소화 관련 효소의 활성을 저하시킬 뿐만 아니라 GLUT4 단백질 발현을 증가시켜 혈당강하 효과가 있음을 알 수 있었다.

또한 구기자 추출물의 혈당강하 및 지방축적 억제 효과를 가지는 성분 규명을 통해 기능성식품인 천연의 약제로 개발할 수 있으리라 기대된다. 또한 추출물이 아닌 구기자의 성분인 zeaxantin, betaine 등으로 추후 더 연구하여 보다 더 정확한 성분을 조사할 필요성이 있다고 사료된다.

요 약

구기자는 식용가능하고 제2형 당뇨병 합병증인 지방간분

해, 고혈압 및 고혈당에 효능이 있다고 알려져 있다. 하지만 당 대사 및 지질 대사에 작용하는 정확한 기작에 대한 연구는 아직 미비하기에 탄수화물 소화효소인 α-amylase와 α-glucosidase의 저해활성 및 정상생쥐를 이용한 혈당강하 효과와 3T3-L1 adipocyte를 통하여 비만축적 억제효과를 보았다. 구기자 추출은 80% MeOH, 70% EtOH 및 열수추출하였으며 이들 중 α-amylase 50% 저해 활성(IC₅₀)은 saliva α-amylase에서 acarbose, 80% MeOH, 70% EtOH, aqueous(7.04, 3.19, 3.20, 3.66 mg/mL), pancreas α-amylase acarbose, 80% MeOH, 70% EtOH, aqueous(10.97, 4.16, 3.07, 3.55 mg/mL)로 saliva α-amylase에선 acarbose보다 80% MeOH, 70% EtOH 추출물이 가장 낮은 농도에서 IC₅₀값을 나타냈고 pancreas α-amylase에서는 70% EtOH 추출물이 가장 낮은 농도에서 IC₅₀값을 나타냈다. 또한 10 µg/mL 농도에서 yeast α-glucosidase 활성저해 IC₅₀값은 80% MeOH, 70% EtOH, aqueous(5.01, 4.98, 4.80 µg/mL)로 구기자 추출물 모두 acarbose(5.05)보다 우수한 IC₅₀값을 나타냈다. 정상생쥐에게 탄수화물 소화효소의 저해활성이 높은 70% EtOH 추출물을 전분과 함께 경구투여 한 후 내당능을 측정된 결과, 전분과 함께 100, 200 mg/kg body weight를 경구투여한 경우, 대조군에 비해 투여 후 30, 60, 90, 120분에 혈당 증가가 낮았다. 또한 추출물을 100 mg보다 200 mg 투여하였을 경우 대조군에 비해 각각 19% 및 40%씩 저하되었으며, 120분에는 대조군 수준이 되었다. 그리고 3T3-L1 adipocyte에서 비만축적 억제효과를 측정된 결과 70% EtOH 추출물 농도가 증가함에 따라 leptin, 중성지방 농도가 감소하였고 유리지방산 농도는 증가하였다. 이상의 연구 결과 구기자 추출물 중 70% EtOH는 acarbose보다 높은 α-glucosidase, α-amylase 저해활성을 나타냈으며, 정상생쥐를 통해 식후 혈당증가를 저하시키는 효과를 확인하였고 GLUT4 발현 역시 증가함을 확인했다. 이를 통해 구기자 추출물이 지방축적 억제와 인슐린 저항성 억제 및 혈당강하 기전을 확인하여 제2형 당뇨병 개선에 효과적인 것으로 판단, 추후 더 연구하여 보다 더 정확한 성분을 조사할 필요성이 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 계명대학교 전통 미생물 자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Kim JL. 2008. Effect of *Helianthus thberosus* extract on anti-obesity and anti-diabetes in cell line. *MS Thesis*. Chonbuk National University, Jeonbuk, Korea.
2. Choi MK. 2001. Effect if *Cordyceps militaris* fractions on glucose uptake and insulin signal transduction in 3T3-L1 adipocytes. *MS Thesis*. Hoseo University, Asan, Korea.

3. Annals for medical insurance statistics. 1993. Ministry of Health and Welfare.
4. Kim EJ. 1998. Diabetology. The Annual Meeting of Federation of the Korean Gerontological Societies for 1998, Seoul, Korea.
5. Estigarribia JA, Darga LL, Reaven GM. 1985. Insulin and blood pressure in obesity. *Hypertension* 7: 702-706.
6. Stoll BA. 1999. Western nutrition and the insulin resistance syndrome: a link to breast cancer. *Eur J Clin Nutr* 53: 83-87.
7. Cho YS. 2004. Studies on hepatoprotective effects of the compounds isolated from the fruits of *Lycium chinensis*. *MS Thesis*. Korea University, Seoul, Korea.
8. Kim KS, Shim SH, Jeong GH, Cheong CS. 1998. Anti-diabetic activity of constituents of *Lycii Fructus*. *J Applied Pharmacol* 6: 378-382.
9. Rene K, Rostand YM, Angele FF. 2008. Antihyperglycaemic potential of the water-ethanol extract of *Kalanchoe crenata* (Crassulaceae). *J Natl Med* 62: 34-40.
10. Subramanian R, Asmawi MZ, Sadikun A. 2008. *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochim Pol* 2: 391-398.
11. Xian-Kang F, Jie G, Dan-Ni Z. 2008. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Science Direct Life Sciences* 82: 615-622.
12. Camichael J, Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. 1978. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 27: 943-946.
13. Bucolo G, David H. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482.
14. Mai TT, Thu NN, Tien PG, Van Ghuyen N. 2007. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 267-276.
15. Asano N, Tomioka E, Kizu H. 1994. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res* 259: 243-255.
16. Asano N, Tomioka E, Kizu H. 1994. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr Res* 253: 235-245.
17. Goldmann A, Milat ML, Ducrot PH. 1990. Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* 29: 2125-2128.
18. Clemetson CA. 1976. Ascorbic acid and diabetes mellitus. *Med Hypotheses* 2: 193-194.
19. Odetti PR, Borgoglio A, Pascale DE, Rolandi A, deazti L. 1990. Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutin. *Diabetes* 39: 796-801.
20. Haller H. 1998. The clinical importance of postprandial glucose. *Diabetes Res Clin Pract* 40: S43-S49.
21. Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins AL. 1988. Starchy foods and glycemic index. *Diabetes Care* 11: 149-159.
22. Carmichael J, Degraff WG, Gadzar AF. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
23. Ahn IS. 2007. *In vitro* antiobesity effect of *Kochujang* and isolation and identification of active compounds. *MS Thesis*. Pusan National University, Busan, Korea.
24. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang P, Considine RV. 1996. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes* 45: 1455-1462.
25. Shiqi Y, Ayman K, Huizhi L, Jiawen H, Tania R, Valina D, Anna MD. 2004. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2: 403-411.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriau-cianas A, Stephenes TW, Nyce MR. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.
27. Kim IH, Nam TJ. 2004. The effects of polymannuronates on leptin in 3T3-L1 adipocytes. *J Kor Fish Soc* 5: 372-379.
28. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci* 92: 9034-9037.
29. Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C. 1996. Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* 271: 2365-2368.
30. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529.
31. Sliker L, Sloop PL. 1996. Surface, Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271: 5301-5304.
32. Kim YG. 2006. The control of preadipocytes differentiation by the extracts of red yeast grown on *Fagopyrum*. *MS Thesis*. Hankyong National University, Gyeonggi, Korea.
33. Kim JL. 2008. Effect of *Helianthus tuberosus* extract on anti-obesity and anti-diabetic in cell line. *MS Thesis*. Chonbuk National University, Jeonbuk, Korea.
34. Dallongeville J, Fruchart JC, Auwerx J. 1998. Leptin, a pleiotropic hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J Med Chem* 41: 5337-5352.
35. Shannon PR, Jean M. 2000. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Biochem Ohys* 125: 285-297.
36. Kim SK, Kim YC, Kim YC. 1998. Effects of singly administered betaine on hepatotoxicity of chlorform in mice. *Food Chem Toxicol* 36: 655-661.
37. Kim SK, Kim YC. 2002. Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem Toxicol* 40: 545-549.
38. Zhang H, Links PH, Ngsee JK, Tran K, Cui Z, Ko KW, Yao Z. 2004. Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. *J Biol Chem* 3: 2221-2230.
39. Goldfine ID. 1987. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr Rev* 3: 235-255.
40. Son HS. 2000. SHIP and insulin signaling pathways. Korean Diabetes Association 13th Spring Meeting, Seoul, Korea.