

미강 페놀산 농축물과 Hydroxycinnamic Acids의 세포내 항당뇨 및 항산화 활성

정은희 · 하태열* · †황인경
서울대학교 식품영양학과, *한국식품연구원

Anti-hyperglycemic and Antioxidative Activities of Phenolic Acid Concentrates of Rice Bran and Hydroxycinnamic Acids in Cell Assays

Eun Hee Jung, Tae Yeol Ha* and †In Kyeong Hwang
Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
*Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Abstract

Phenolic acid concentrates of rice bran(RB-ex) and hydroxycinnamic acids were investigated for their anti-hyperglycemic activities through glucose uptake and glucokinase activity using HepG2 cells and stimulatory effects on insulin secretion using HIT-T15 cells. RB-ex was prepared as an ethylacetate extract after alkaline hydrolysis and hydroxycinnamic acids, found as major compositions of RB-ex, such as ferulic acid(FA), sinapic acid(SA) and *p*-coumaric acid(*p*-CA) were investigated to compare with the properties of RB-ex. The properties of glucose uptake in HepG2 cells were examined in the absence of insulin and two different glucose concentrations(5.5 mM and 25 mM). RB-ex and FA showed anti-hyperglycemic activities through the increase of glucose uptake and the stimulation of glucokinase activity in HepG2 cells. RB-ex exhibited higher glucose uptakes with higher glucose concentrations, whereas FA exhibited the same increasing effects on both concentrations of glucose. RB-ex and FA exhibited doubled glucokinase activities relative to control. In the presence of insulin in the 25 mM glucose-containing medium, the levels of glucose uptake were increased in all treatments compared with control. As stimulatory effects of samples on insulin secretion were estimated, RB-ex and FA stimulated insulin secretion at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and in particular, FA showed the highest amount of insulin-release in HIT-T15 cells. Antioxidative effects on HIT-T15 cells, RB-ex and hydroxycinnamic acids, excluding *p*-CA, showed inhibitory activities of 78% to 80% at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. On the basis of these results, we conclude that RB-ex and FA could help decrease blood glucose levels and prevent the cell damages via antioxidant activity.

Key words: rice bran, ferulic acid, hydroxycinnamic acid, anti-hyperglycemic acid.

서 론

당뇨병은 혈당을 조절하는 인슐린 분비능 또는 분비된 인슐린 작용의 결함에 의해 고혈당이 수반되는 대사성 질환으로서, 유전적 및 환경적인 요인에 의하여 발병하는 것으로 알려져 있다(Baynes JW 1991). 현대인들의 식생활과 관련된 만

성질환 중 당뇨병의 발병률은 꾸준히 증가하여, 세계보건기구의 통계자료에서 당뇨병 환자의 수는 약 1억 5,100만 명으로 한 해에 발병 증가율이 5%에 해당한다고 보고하였다(Zimmet 등 2001). 현재 조사된 국내 당뇨병 환자의 수는 약 400만 명으로 국민 10명 중 1명이 당뇨병을 앓고 있으며, 발병되는 연령층도 점점 낮아지고 있어 사회, 경제적으로 큰 문제가 되고

† Corresponding author: In Kyeong Hwang, Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, 599, Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea. Tel: +82-2-880-6837, Fax: +82-2-884-0305, E-mail: ikhwang@snu.ac.kr

있다(Beak SH 2007). 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성이나 인슐린 분비 저하가 나타나는 특징이 있으며, 한국인 제2형 당뇨병 환자의 경우 공복 인슐린 농도 및 식후 혈당 증가에 따른 인슐린의 분비량이 서구인에 비해 매우 낮은 특징을 보인다(Chang 등 1998). 제2형 당뇨병 발생 원인으로 생체 내 항산화 방어 기전의 저하로 인한 자유라디칼 증가 및 산화적 스트레스에 의한 조직 손상과 관련이 높다고 알려져 있다(Wolff SP 1993). 체내 항산화 방어체계에는 항산화 효소, 비타민 C, 비타민 E, 폴리페놀 등에 의해 유지되고 있으며, 식품 등을 통해 보충할 수 있으며, 천연 항산화제, 폴리페놀 또는 단일 페놀산은 각종 산화에 의해 생성되는 산화물질들을 조절하여 혈액 내의 산화 LDL 수준을 낮추거나 과산화물의 생성을 억제함으로써 지질대사의 개선 효과를 나타내며(Hiramatsu 등 1990; Rukkumani 등 2004), 당 대사에서 인슐린의 기능을 보조해 주거나 간에서 글리코겐 생성을 높여줌으로써 혈당 저하에 관여한다고 보고하였다(Peungvicha 등 1998; Waltner-Law 등 2002).

한편, 역학조사에서는 각종 성인병 예방을 위해 전곡류의 섭취를 늘릴 것을 강조하고 있고, 질병 치료를 위해 항산화 활성 등 생리활성이 높은 식품을 섭취할 것을 권하고 있다(Kushi 등 1999; Simin 등 1999). 현재 우리의 주식으로 많이 섭취되고 있는 쌀은 에너지 급원으로 오랫동안 역할을 해왔으며, 현미에는 3대 영양소 이외에 비타민, 무기질, 섬유질, 그리고 항산화 물질 등을 함유하고 있어 한국인의 건강 유지를 위해 좋은 급원이 된다. 하지만 기호도 문제 등으로 인해 현미식 보다는 미강 부분을 제거한 백미식 위주로 섭취하고 있고, 현미의 외피부분인 미강은 대부분 부산물로서 가축 사료 등에 이용되고 있다. 미강에는 생리활성을 가진 물질, 비타민 B₁, 비타민 B₂, *r*-oryzanol, 페놀산이 함유되어 있으며, 특히 미강의 페놀산은 폴리페놀의 한 종류로서 항산화 활성과 함께 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다(Cheruvanky R 2000). 곡류 등 식물의 세포벽에는 hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid 계열의 페놀산이 일부는 유리형태로, 그리고 대부분은 세포벽 다당체에 ester 결합상태로 존재하고 있고, ferulic acid, *p*-coumaric acid, benzoic acid, sinapic acid 등이 존재하며, 미강에도 이러한 페놀산 종류들이 분포되어 있다고 알려져 있다(Faulds & Williamson 1999). 최근 보고된 연구에서 ferulic acid가 제1형 당뇨병모델 쥐에서 간의 과산화물 생성 감소 및 혈당 강하 효과(Ohnishi 등 2004)를 나타냈고, 미강에서 얻은 페놀산 추출액을 제2형 당뇨병모델에 적용한 결과, 인슐린 분비력 향상과 함께 혈당 강하 효과를 나타낸 것으로 보고되었다(Jung 등 2007).

본 연구에서는 미강을 가수분해한 후 에틸아세테이트로 추출하여 얻은 미강 페놀산 농축물과 hydroxycinnamic acids의

항당뇨 활성에 미치는 영향을 분석하고자, 인간 유래의 간세포(HepG2 cell)를 배양하여 당 유입 및 glucokinase 효소 활성을 측정하였고, 췌장 세포(HIT-T15 cell)의 인슐린 분비에 미치는 영향과 활성 산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성 억제에 대한 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 미강 페놀산 농축물의 조제 및 시료 준비

미강 페놀산 농축물(phenolic acid concentrates of rice bran, RB-ex)을 조제하기 위해 탈지미강 20 g에 1 M NaOH 100 ml 가하여 15시간 동안 질소충진 상태로 20°C에서 가수분해를 실시하였다(Baltolome & Gomez-Cordoves 1999). 1 M HCl로 산성 조건을 만들어 준 다음 에틸아세테이트를 이용해 총 3 반복하여 추출하였다. 에틸아세테이트 분획층은 감압·농축하여 완전히 건조시킨 다음 80% 메탄올에 녹여 수거하였으며, 페놀산 이외의 불순물들을 정제하기 위해 Sep-pak C₁₈ Vac cartridge(Waters Co., Dublin, Ireland)를 통과시켜 50% 메탄올에 용해되는 페놀산 분획만을 모아 다시 감압·농축하여 시료로 사용하였다. 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 변형된 Folin-Ciocalteu 법으로 측정하였다(Singleton & Rossi 1965). Ferulic acid(Sigma Chemical Co.)로 표준 검량 곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량은 100 g 중의 mg ferulic acid로 나타내었다. Hydroxycinnamic acid인 ferulic acid(FA), *p*-coumaric acid (*p*-CA), sinapic acid(SA)를 Sigma Chemical Co.(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용한 HepG2 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였고, 10% fetal bovine serum(GIBCO, USA)과 1% penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA) 배지에서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하는 배양기(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Japan)에서 배양하였으며, 2~3일마다 계대 배양을 실시하였다. HIT-T15 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 10% fetal bovine serum, 0.4% penicillin-streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지(11 mM 포도당 포함, GIBCO, USA)를 사용하여, 5% CO₂와 37°C 조건하의 세포 배양기에서 배양하였다. 배지는 2일마다 한 번씩 새로운 배지로 바꿔주었고, 5일마다 한번씩 계대를 실시하였다.

3. MTT Assay

Cell viability을 조사하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay을 실시하였다. HIT-T15 세포를 50×10^4 cell/ml가 되도록 96 well plate에 분주하고 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 fetal bovine serum이 첨가되지 않은 배지에 시료의 농도를 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후, 48시간 동안 배양하였다. 50 $\mu\text{g/well}$ 농도의 MTT 시약을 분주한 다음 4시간 후 MTT가 formazan으로 환원되는 정도를 microplate reader(Bio-rad, Benchmark, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 대조군의 흡광도를 기준으로 viability를 산출하였다.

4. 포도당 유입량 측정

96 well plate에 30×10^4 cell/ml가 되도록 분주하여 24시간 동안 배양하고, 다른 포도당 농도에서 시료가 세포의 당 유입에 미치는 영향을 조사하였고, 또한 고농도 포도당 존재 하에서 인슐린(10 $\mu\text{g/ml}$)의 존재 여부에 따라 시료가 당 유입에 미치는 영향을 조사하였다(Yin 등 2002). 시료의 농도는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 분주하고 1시간 동안 37°C에서 정지한 후, 각각 5.5 mM, 25 mM 포도당 농도를 달리한 배지로 바뀌준 후 12시간 동안 배양하였고, 반응종결 후 배지로부터 10 μl 씩 취하여 남아있는 포도당 농도를 측정하였다. 포도당 농도는 glucose trinder kit(Sigma Chemical Co., USA)을 사용해 측정하였다. 세포가 포함되지 않은 배지를 공시료로 사용하였고, 대조군으로는 배지만 처리하여 측정된 값을 기준으로, 세포내 당 유입률은 배지에 남아있는 포도당 농도(mg)를 각각의 세포수(30×10^4 cells)로 계산하여 나타내었다.

5. Glucokinase 활성 측정

세포를 96 well plate에 30×10^4 cell/ml가 되도록 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 인슐린(10 $\mu\text{g/ml}$)이 포함된 25 mM 포도당 배지에서 각 시료들을 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 다음 24시간 동안 배양하고, 인산 완충액으로 세척하여 microtube에 수거하였다. 효소액을 얻기 위해 microtube에 500 μl 의 lysis buffer를 넣고, 10분간 용해한 뒤 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수했다. 회수된 상층액에 250 μl homogenizing buffer(50 mM Tris-HCl, 100 mM mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 7.4)을 넣고 4°C에서 60분간 12,000×g에서 초원심분리한 후 상층액을 모아 glucokinase 활성 측정에 이용하였다. Glucokinase 반응액은 200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM NADP, 5 mM ATP, 50 mM과 0.5 mM glucose, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)가 되도록 하였고, 효소액은 20 μl 와 glucokinase 반응액 980 μl 를 섞어 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. Glucokinase 활성에 따른 glucose-6-phosphate(G6P)가 G6PDH와 반응할 때 nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate(NADP⁺)가 NADPH로 환원되는 것을 이용하여 glucokinase 활성도를 측정하였다. 반응에 의해 생성된 NADPH 생성률은 340 nm에서 반응시작과 반응시간 20분 후 흡광도 증가율로 측정하였다(Davidson & Arion 1987). Glucokinase 효소 활성도는 50 mM 포도당을 첨가하여 얻은 흡광도에서 0.5 mM 포도당을 첨가하여 얻은 흡광도를 뺀 값을 취하여 1분당 효소액 단백질 1 mg에 의해 인산화되는 포도당의 농도(nmol/min/mg protein)로 계산하였다. 효소액의 단백질 농도는 Lowry의 변형된 방법으로 구하였다(Lowry 등 1951).

6. 인슐린 분비능 측정

HIT-T15 세포를 6 well plate에 30×10^4 cell/ml가 되도록 분주하고, 24시간 배양한 다음 세포로부터 배지를 완전히 제거하고, 포도당이 없는 Krebs-ringer buffer(pH 7.4)를 가한 후 37°C에서 1시간 동안 전처리 한 후, 포도당 농도에 따른 인슐린 분비력을 측정하기 위해 2 mM 포도당과 11 mM 포도당 조건에 세포를 노출시킨 다음, 양성대조군은 2.5 nM exendin-4, 시료는 25 $\mu\text{g/ml}$ 씩 각각 첨가하고, 30분 동안 반응했을 때 분비된 인슐린 양을 Insulin Kit(ELISA kit, Shibayagi, Japan)을 사용하여 측정하였다(Nomura 등 2003).

7. 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 측정

HIT-T15 세포를 96 well plate에 30×10^4 cell/ml가 되도록 분주한 후 24시간동안 배양하고, 각각의 시료들을 농도별(10, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 전처리하였다. 0.1 mM H_2O_2 를 세포에 처리한 후 30분간 배양하고, 에탄올에 녹인 100 μM DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, Sigma Chemical Co., USA)를 10 μl 씩 넣었다. 30분 동안 염료를 세포내로 통과하여 반응을 시킨 다음, excitation wavelength 485 nm와 emission wavelength 535 nm에서 multiple plate reader (Model Victor 3, Perkin Elmer, USA)을 이용하여 fluorescence를 측정하였다. Fluorescence Intensity(F.I.)는 대조군(무처리군)에 대한 relative inhibition(%)으로 나타내었다.

8. 통계분석

통계처리는 SAS/STAT TM User's guide 8.0판 프로그램을 이용하여 평균치와 표준편차로 표시하였다. 분산분석(ANOVA analysis of variance) 후 유의성($p < 0.05$ 이하)을 검증하였고, Duncan의 다중범위시험을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 포도당 유입량에 미치는 영향

제조된 미강 페놀산 농축물(phenolic acid concentrates of rice

bran, RB-ex)의 회수율은 1.32%이었고, RB-ex의 페놀산 함량을 측정된 결과 732 mg%으로 조사되었다. 시료들의 혈당 강하 활성을 조사하기 위해 간세포(HepG2 cell)를 배양하여 시료의 첨가가 당의 세포내 유입에 미치는 영향을 조사하였고, 결과는 Fig. 1, Fig. 2와 같다. 5.5 mM 포도당에서 12시간 배양한 후 시료의 처리농도(50, 100 $\mu\text{g/ml}$)에 따른 세포내 당 유입을 조사한 결과, RB-ex과 FA는 처리농도에 의존적으로 세포내 당 유입량이 증가됨을 알 수 있었다. 즉, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 RB-ex와 FA의 포도당 잔존물(residual glucose)은 각각 0.085 mg, 0.055 mg이었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 RB-ex와 FA의 포도당 잔

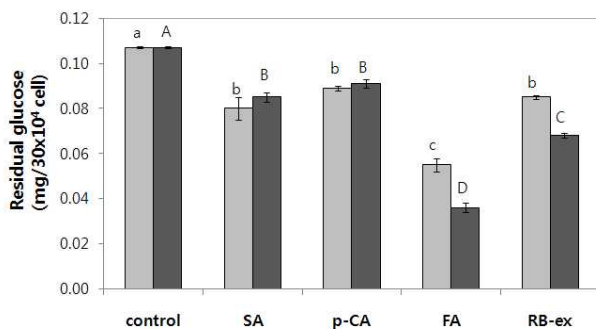


Fig. 1. Effects of RB-ex and hydroxycinnamic acids on glucose uptake level depending on the sample concentrations (□ 50 $\mu\text{g/ml}$, ■ 100 $\mu\text{g/ml}$) in HepG2 cells. The cells were incubated in the absence of insulin at 5.5 mM glucose media for 12 hr. ^{A~C}, ^{a~c} Values on the column with superscripts were significantly different at $p < 0.001$ by Duncan multiple range test. SA, sinapic acid, p-CA, p-coumaric acid, FA, ferulic acid, RB-ex, phenolic acid concentrates of rice bran.

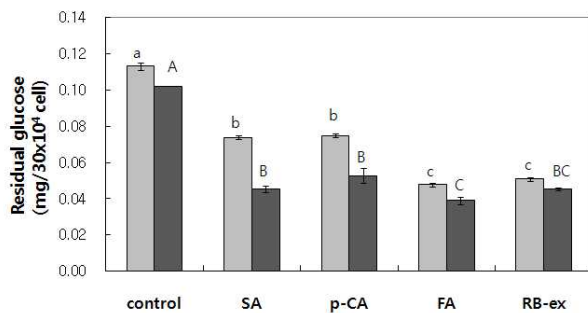


Fig. 2. Effects of RB-ex and hydroxycinnamic acids on glucose uptake level in HepG2 cells. The cells were incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ samples in the absence of insulin (□) or presence of insulin (■) and samples at 25 mM glucose media for 12 hr. ^{A~C}, ^{a~c} Values on the column with different superscripts were significantly different at $p < 0.001$ by Duncan multiple range test.

존율은 각각 0.068 mg, 0.036 mg으로 나타남으로써, 대조군 (0.107 mg)과 비교해 59%의 포도당 유입량 차이를 나타냈다. 반면, SA와 p-CA는 포도당 유입량에서 대조군에 비해 약 18~27%의 미비한 감소를 보였다.

25 mM 포도당에서 인슐린 첨가 유무에 따른 변화를 알아보기 위해, 시료 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 당 유입량 변화를 관찰하였다. 인슐린이 존재하지 않은 상태에서 세포내 당 유입은 RB-ex과 FA에 의해 뚜렷한 증가를 나타내었으며($p < 0.001$), 배지에 남아 있는 포도당(residual glucose)의 농도를 측정된 결과, FA(0.046 mg), RB-ex(0.048 mg), SA(0.073 mg), p-CA(0.078 mg) 순으로 증가하였다. 한편, 인슐린을 첨가한 조건에서는 인슐린에 의해 당 유입량이 촉진되었으며, 특히 SA와 p-CA는 인슐린 첨가에 의해 뚜렷한 차이를 나타냈으며, 배지에 남아있는 포도당의 농도는 FA(0.039 mg), RB-ex(0.045 mg), SA(0.045 mg), p-CA(0.05 mg) 순으로 증가하였다. 간조직은 인슐린에 민감하게 반응하여 당 이용(glucose utilization)과 당신생작용(gluconeogenesis)을 조절함으로써 당 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 하지만 제2형 당뇨병 환자나 비만자의 경우 인슐린 저항성에 의해 당수송체의 기능 손상으로 조직 내의 당 유입이 감소되며, 인슐린 저항성에 의한 당 유입 감소 기전은 구체적이지 못하지만, 지방산 산화 및 유리지방산 증가가 간조직의 당 이용을 억제하는 것으로 알려져 있다(Abel 등 2001). Yin 등(2002)은 항당뇨 활성 보고에서 berberine이라는 물질이 간세포에서 인슐린 없이 당 이용성을 향상시킴으로써 혈당 강하 작용을 나타낸다고 하였고, 포도당 농도에 따라 당 이용성이 증가되었지만, 고농도 포도당(22 mM 포도당)에서는 당 이용성 활성이 낮아지는 것으로 보고하였다. Berberine과 비교했을 때 FA 및 RB-ex은 인슐린 없이 고농도 포도당 조건에서 효과적으로 당 이용성을 증가시켰고, 인슐린에 의해 그 효과가 더 증가시킴으로써 이와 같은 활성은 항당뇨 활성에 중요한 영향을 줄 것으로 기대된다.

2. Glucokinase 활성에 미치는 영향

간 세포에서 당의 이용 증가는 glucokinase 활성과 밀접한 관련을 갖는다. 따라서 RB-ex 및 hydroxycinnamic acids가 간 세포의 glucokinase 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). 25 mM 포도당이 함유된 배지에서 glucokinase 활성이 FA, RB-ex에 의해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), SA, p-CA는 glucokinase 활성에 영향을 미치지 않았다. 간에서 glucokinase에 의한 당의 수송과 인산화는 당 이용도 조절에서 가장 중요한 단계로서, 간으로 포도당이 유입되었을 때 가장 먼저 포도당을 인산화 시키고, hexokinase보다 포도당에 대해 높은 친화력(Km)을 가지고 있어 glucokinase 활성도를 측정함으로써 당의 이용도에 미치는 영향을 측정할 수 있다. 일반적으로 제

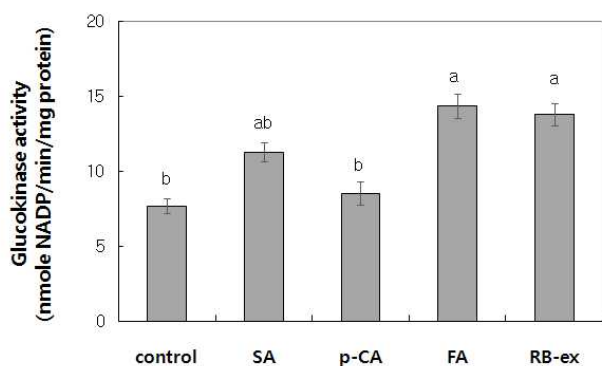


Fig. 3. Effects of RB-ex and hydroxycinnamic acids on the activity of glucokinase in HepG2 cells. The cells were incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ samples in the presence of insulin at 25 mM glucose media for 12 hr. ^{ab} Values on the column with different superscripts were significantly different at $p < 0.001$ by Duncan multiple range test.

2형 당뇨병 환자의 경우, 간조직의 당 이용성 감소는 간조직의 glucokinase 활성도와 관련이 높은 것으로 보고되어 있으며(Tura 등 1996), 인슐린 저항성으로 인한 인슐린 기능 저하는 glucokinase 활성 및 glycogen 합성 감소를 나타내며, 이러한 감소는 인슐린 투여에 의해 정상적으로 나타난다고 보고하였다(Pratipanawatr 등 2002).

3. 세포 성장을 및 인슐린 분비능에 미치는 영향

HIT-T15 세포는 Syrian hamster에서 유래된 정상 췌장 β -세포로서 인간 췌장 조직과 유사한 기전을 가지며, 포도당 농도에 비례하여 인슐린 분비가 촉진되며, 사람과 마찬가지로 단일 proinsulin gene을 가지고 있기 때문에 인슐린 분비 조절 능력이 인간과 비슷한 조건을 가질 것으로 보고 있어 베타 세포의 생리 연구를 하는 데 적합한 세포주로 알려져 있다(Zhang 등 1989). RB-ex 및 hydroxycinnamic acids가 췌장 세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위해 시료의 농도 구배(25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 따른 세포 성장을 조사하였으며, 대조군에 대한 비율로 나타냈고, 그 결과는 Fig. 4와 같다. SA는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 증식 효과가 나타났으며, RB-ex과 p-CA도 모든 농도에서 유의적으로 증식 효과를 나타내었다. 반면, FA는 모든 농도에서 세포 증식에 아무런 영향을 주지 않았다. 이와 같은 세포 성장률 증가는 RB-ex, SA, p-CA에 의한 세포 증식 효과로 보이며, 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

RB-ex과 hydroxycinnamic acids가 HIT-T15 세포의 인슐린 분비능에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. 2 mM 포도당과 11 mM 포도당 두 가지 조건에서 FA와 RB-ex는 효과적으로 인슐린 분비를 촉진시켰다. 2 mM 포도당 농도에서 인슐

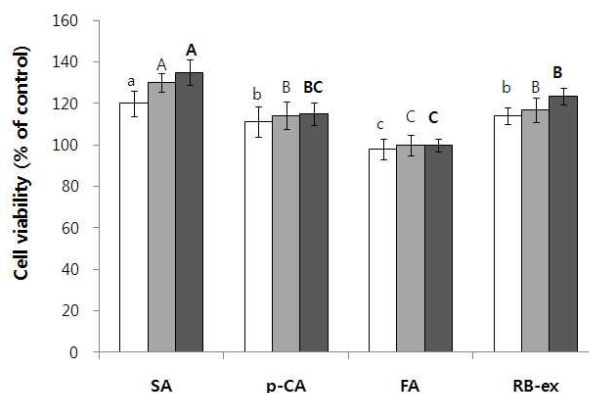


Fig. 4. Effects of RB-ex and hydroxycinnamic acids on viability in HIT-T15 cells. The cells were incubated with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (\square), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (\square), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (\blacksquare) samples for 24 hr. Cell viabilities were assessed using the MTT-based viability assay. ^{A~C, a~c} Values on the column with different superscripts were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test.

Table 1. Effects of RB-ex and hydroxycinnamic acids on insulin secretion in HIT-T15 cells¹⁾

Samples	Insulin secretion(pg/ml) ²⁾	
	2 mM glucose	11 mM glucose
Control	720.2 \pm 75.3 ^b	750.5 \pm 73.7 ^b
Exendin-4	760.2 \pm 34.2 ^b	1,271.3 \pm 31.9 ^{ab}
SA	648.0 \pm 72.5 ^c	720.3 \pm 49.8 ^c
p-CA	620.5 \pm 82.5 ^c	647.3 \pm 93.3 ^c
FA	1,447.2 \pm 80.2 ^a	1,432.2 \pm 155.4 ^a
RB-ex	1,105.5 \pm 87.6 ^{ab}	1,333.8 \pm 80.9 ^a

¹⁾ Cells were incubated with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ samples at 2 mM glucose and 11 mM glucose Krebs-ringer buffer media for 30 min. Insulin contents were estimated by ELISA. Positive control(2.5 nM Exendin-4).

²⁾ Data are expressed as mean \pm S.E.(n=3). ^{a~c} Different letters within a column were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test. SA, sinapic acid, p-CA, p-coumaric acid, FA, ferulic acid, RB-ex, phenolic acid concentrates of rice bran.

린 분비는 FA(1,447.2 \pm 80.2 pg/ml)와 RB-ex(1105.5 \pm 87.6 pg/ml)에 의해 증가되었고, 반면 p-CA, SA는 대조군과 비교해 별다른 차이가 없었으며, 양성대조군으로 첨가한 exendin-4에서도 마찬가지로 대조군과 차이가 없었다. 한편, 11 mM 포도당 농도에서 시료의 인슐린 분비에 미치는 영향을 측정된 결과, 세포로부터 분비된 인슐린 양은 FA가 1,432.2 \pm 155.4 pg/ml , RB-ex는 1,333.8 \pm 80.9 pg/ml 로 인슐린 분비를 향상시켰고, p-CA, SA

는 세포의 인슐린 분비에 아무런 영향을 미치지 않았으며, 반면 exendin-4는 $1,271.3 \pm 31.9$ pg/ml로 인슐린 분비를 촉진하였다. Exendin-4는 췌장 세포로부터 포도당 농도에 의존하여 인슐린 분비를 자극하는 것을 알 수 있었다. Exendin-4는 glucagon-like peptide (GLP-1) 수용체에서 효능제로 작용하며 분리된 췌장의 랑게르한스 섬에서 인슐린 분비를 증가시키는 것으로 보고된 물질이다(Eng 등 1992). Ferulic acid의 인슐린 분비를 촉진시키는 활성은 다른 연구를 통해서도 확인할 수 있으며, rat 유래 췌장 세포인 RIN-5F 세포에 ferulic acid를 $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때 췌장에서 분비되는 인슐린은 8 ng/ml 이상으로 다른 페놀성 화합물에 비해 높은 것으로 조사되었다(Nomura 등 2003).

4. 세포내 ROS 제거능

시료의 췌장 세포에 대한 항산화 활성을 측정하기 위해 세포내 ROS 제거능을 조사하였고, 결과는 Fig. 5와 같다. 시료 농도 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 ROS 제거능은 FA와 RB-ex의 경우, 60%의 ROS 소거 활성을 나타냈고, SA는 비교적 낮은 수준을 나타냈고, 양성 대조군인 vitamin C의 경우도 SA와 비슷한 수준의 활성을 나타냈다. 한편, $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 FA, RB-ex는 ROS 제거 활성이 약 80%를 나타냈고, SA, vitamin C는 78%의 저해활성을 나타냈다. 반면, p-CA는 모든 농도에서 세포내 H_2O_2 에 의한 hydroxyl radical(OH·)의 형성을 효과적으로 저해하지 못했다. FA, SA, RB-ex는 hydroxyl radical(OH·)에 대해 높은 저해활성을 보임으로써 손상된 세포나 조직에서 항산화 효과를 통해 정상적인 기능을 유지하는 데 기여할 것으로 사료된다. Hydrogen peroxide(H_2O_2)는 세포독성이 강하

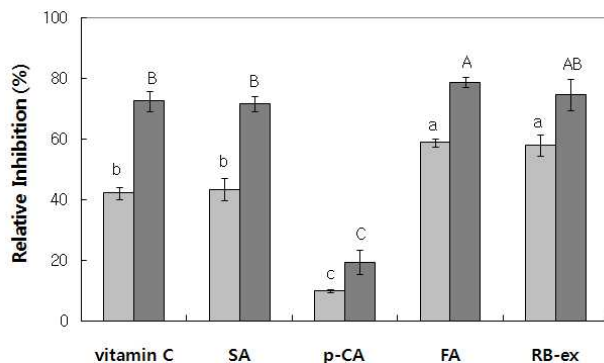


Fig. 5. Scavenging effects of samples on intracellular reactive oxygen species(ROS) in HIT-T15 cells. The cells were incubated with $10 \mu\text{g/ml}$ (□), $100 \mu\text{g/ml}$ (■) for 4 hr and were subjected to oxidative stress using $0.1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ for 30 min. ^{A~C}, ^{a~c} Values on the column with different superscripts were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan multiple range test.

고, 세포내에서 강한 hydroxyl radical(OH·)을 형성하여 세포내 단백질이나 DNA와 반응하여 파괴함으로써 세포사멸을 유도하는데, 췌장은 항산화 효소(superoxide dismutase, peroxidase)의 활성이 매우 낮아 내부의 ROS에 대한 방어 시스템이 취약한 조직으로 알려져 있으며, 특히 당뇨병 질환에 의해 포도당 독성에 따른 산화적 스트레스는 췌장 β 세포의 정상적인 기능을 방해하고, 인슐린 생합성 감소와 관련한 상관성이 높은 것으로 알려져 있다(Tiedge 등 1997).

요약 및 결론

미강 페놀산 농축물 및 hydroxycinnamic acids의 항당뇨 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포내 당 유입량과 glucokinase 효소 활성을 측정하였고, 췌장 세포에서 시료의 인슐린 분비에 대한 효과를 조사하였으며, 물질의 ROS에 의한 세포 손상의 보호 효과를 조사하였다. 미강 페놀산 농축물인 RB-ex와 FA는 간세포(HepG2 cell)에서 세포내 당 유입량을 크게 증가시켰으며, SA와 p-CA는 대조군에 비해 높은 당 유입량을 나타냈다. 25 mM 포도당 농도에서 인슐린 존재하는 경우, 시료 첨가군 모두에서 세포내 당 유입량 증가를 나타냈으며, FA>RB-ex>SA>p-CA 순이었다. Glucokinase의 활성을 측정한 결과, FA와 RB-ex에 의해 효소 활성이 크게 증가하였다. 한편, FA와 RB-ex는 HIT-T15 세포의 인슐린 분비력에 강한 활성을 나타냈으며, p-CA와 SA는 세포의 인슐린 분비에 영향을 미치지 않았다. 그러나 양성 대조군인 exendin-4와 같이 포도당 농도 구배에 따른 인슐린 분비 촉진은 나타나지 않았으며, 모든 포도당 농도에 반응하여 인슐린 분비를 나타냈다. 항산화 활성 측정결과, RB-ex, FA, SA는 H_2O_2 처리에 따른 ROS 생성을 유의적으로 감소시킴으로써 췌장 세포의 자유라디칼에 의한 손상으로부터 보호하는 효과가 있었다. 본 연구결과, RB-ex 및 hydroxycinnamic acids는 항당뇨 활성을 나타내는 것으로 사료되며, 특히 FA와 RB-ex는 glucokinase 활성 증가 및 세포내 당 유입 증가, 인슐린 분비의 촉진은 혈당 상승을 억제시키는 데 도움을 줄 것으로 보이며, 항산화 성분이 췌장 조직을 보호함으로써, 고혈당으로 인한 조직의 손실을 막아주는 등 항당뇨 기전에 이로운 작용을 할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Abel, ED, Peroni O, Kim JK, Kim UB, Boss O, Hadro ED, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733

- Baynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412
- Baltolome B, Gomez-Cordoves C. 1999. Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acid (ferulic and *p*-coumaric acids) by commercial enzyme preparation. *J Sci Food Agric* 79:435-439
- Balasubashini MS, Rukkumani R, Menon VP. 2003. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetol* 40:118-122
- Baek SH. 2007. Prevention of type 2 diabetes. *Medical Postgraduates* 3:128-131
- Chang YS, Ahn HS, Kim H. 1998. Effects of vitamin E supplementation on the lipid peroxides and activities of antioxidative enzymes in the pancreas of diabetic KK mice. *Korean J Nutr* 31:153-158
- Cheruvanky R. 2000. Phytochemical Functional Foods. Phytochemical Products: Rice Bran. pp.347-376. CRC press
- Davidson AL, Arion WJ. 1987. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: Physiological implications of higher cellular activity. *Arch Biochem Biophys* 253:156-167
- Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. 1992. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 15:7402-7405
- Faulds CB, Williamson G. 1999. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall, review. *J Sci Food Agric* 79:393-395
- Hiramatsu K, Tani T, Kimura Y, Izumi SI, Nakane PI. 1990. Effect of *r*-oryzanol on atheroma formation in hypercholesterolemic rabbits. *Tokai J Exp Clin Med* 15:299-306
- Jung EH, Kim SR, Hwang IK, Ha TY. 2007. Hypoglycemic effect of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Agric Food Chem* 55: 9800-9804
- Kushi LH, Meyer KA, Jacobs JD. 1999. Grains, legumes, and chronic disease risk reduction. Evidence epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 70:451s-458s
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-272
- Nomura E, Kashiwada A, Hosoda A, Nakamura K, Morishita H, Tsuno T, Taniguchi H. 2003. Synthesis of amide compounds of ferulic acid, and their stimulatory effects on insulin secretion *in vitro*. *Bioorg Medicinal Chem Letters* 11:3807-3813
- Ohnishi M, Matuo T, Tsuno T, Hosoda A, Nomura H, Taniguchi H, Sasaki H, Morishita H. 2004. Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice. *BioFactors* 21:315-319
- Peungvicha P, Temsiririrkkul R, Prasain JK, Tezuka Y, Kadota S, Thirawarapan SS, Watanabe H. 1998. 4-Hydroxybenzoic acid: A hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *J Ethnopharm* 62:79-84
- Pratipanawatr T, Cusi K, Ngo P, Pratipanawatr W, Mandarino LJ, DeFronzo RA. 2002. Normalization of plasma glucose concentration by insulin therapy improves insulin-stimulated glycogen synthesis in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:462-468
- Rukkumani R, Aruna K, Varma PS, Menon VP. 2004. Ferulic acid, a natural phenolic antioxidant modulates altered lipid profiles during alcohol and thermally oxidized sunflower oil induced toxicity. *J Nutra Func Med Food* 4:119-132
- Simin L, Meir JS, Frank BH, Edward G, Eric R, Joann EM, Charles HH, Walter CW. 1999. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease : Result from the nurses health study. *Am J Clin Nutr* 70:412-419
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Tura F, Anna P, Efren R, Fatima B, Alfons V. 1996. Correction of diabetic alteration by glucokinase. *PNAS* 93:7225-7230
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742
- Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. 2002. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 38:34933-34940
- Wolff SP. 1993. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 49:642-652
- Yin J, Hu R, Chen M, Tang J, Li F, Yang Y, Chen J. 2002. Effects of berberine on glucose metabolism *in vitro*. *Meta Clin Exp* 51:1439-1443
- Zimmet P, Albert K, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787
- Zhang H, Walseth TF, Robertson RP. 1989. Insulin secretion and cAMP metabolism in HIT cells. *Diabetes* 38:44-48