

지골피, 동충하초, 가시오가피 복합추출물이 고평도당 조건에서 배양한 HepG2 세포의 당대사 관련 효소 활성화에 미치는 영향

김대중¹ · 김정미¹ · 김태혁¹ · 백종미¹ · 김현숙² · 최 면^{1,2*}

¹강원대학교 생명건강공학과

²강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터

Effects of Mixed Extract from *Lycium chinense*, *Cordyceps militaris*, and *Acanthopanax senticosus* on Glucose-Regulating Enzymes of HepG2 in Hyperglycemic Conditions

Dae Jung Kim¹, Jeong Mi Kim¹, Tae Hyuk Kim¹, Jong Mi Baek¹,
Hyun Sook Kim², and Myeon Choe^{1,2*}

¹Dept. of Bio-Health Technology, ²Well-being Bioproducts RIC Center,
Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract

This study investigated the anti-diabetic effects of the mixed water extract (JDG 100) composed of *Lycii Cortex*, *Acanthopanax senticosus* and *Cordyceps militaris* on glucose-regulating key enzymes such as glucokinase (GK), acetyl-CoA carboxylase (ACC). In the current study, HepG2 cells were exposed to pathological condition such as hyperglycemic condition (4.5 g glucose/L) with JDG 100 and then experiments such as RT-PCR and Western blotting were carried out. JDG 100 treated cells increased to $168 \pm 0.04\%$ and $182.4 \pm 0.03\%$ in GK mRNA and protein expressions, respectively, compared to control. Treatment of the JDG 100 up-regulated ACC mRNA ($127.3 \pm 0.02\%$) and protein ($126.7 \pm 0.24\%$) of HepG2 cells in the high glucose media. These observations suggest that JDG 100 mixed water extract may have a potential as an anti-diabetic agent in type 2 diabetes mellitus.

Key words: antidiabetic, hyperglycemic conditions, glucokinase, acetyl-CoA carboxylase, HepG2

서 론

전체 당뇨의 90%에 해당하는 제2형 당뇨병은 근육, 간, 지방조직에서 다양한 요인에 의해 인슐린 작용이 저하되어 췌장의 베타세포가 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 만큼 인슐린을 분비하지 못하여 상승된 혈당을 제거하지 못한 결과로 높은 혈중 포도당 농도가 지속될 때 유발된다(1-3). 당뇨에 의한 만성적인 고혈당은 당뇨병성 망막변증, 신장 기능장애 및 동맥경화증 등의 급·만성 합병증을 유도하는 것으로 알려져 있으나 아직까지 근원적으로 치료할 수 있는 약물을 개발하지 못하고 있는 실정이며(4), 근래에 와서는 오랫동안 민간약용으로 쓰여 온 약용 식물의 혈당강하효과에 대한 관심이 증대되고 이 분야에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

지골피(*Lycii cortex*)는 구기자나무의 근피로써 독특한 향이 나며 당뇨와 해열, 혈압강하 작용(5,6)이 있으며, 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 나비목의 유충 또는 번데기를

기주로 하는 곤충 기생균의 일종으로 당뇨 쥐에서 혈당강하 작용(7) 및 면역세포 탐식능 강화작용, 항산화 작용(8), 항암 작용(9) 등의 다양한 효능이 알려져 있다. 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)는 두릅나무과의 식물로 항암 작용(10), 항피로(11), 항당뇨(12) 작용이 있다. 이들 천연소재들의 항당뇨 효과에 대한 결과는 몇몇 연구자에 의해 보고되고 있다. 가시오가피의 뿌리 추출물이 당뇨유발 동물모델에서 인슐린 저항성을 증대시킨다는 보고를 비롯하여 다양한 부위 중 과실의 부탄을 추출물은 혈당강하 효과와 더불어 GLUT4 발현을 조절함으로써 체내의 포도당 항상성을 유지하며(12,13), oxygen free radical 생성계 효소인 xanthine oxidase O type의 활성을 억제시켜 조직의 손상을 방어해 줌으로써 항당뇨 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다(14). 오가피를 발효시키면 cytokine 및 streptozotocin에 대한 저항성이 증가하여 혈당 강하효과가 증가됨이 보고되었는데(15), 발효된 오가피를 전처리하면 islets의 인슐린 분비능이 거의 정상과 비슷한 정도로 회복됨을 관찰하였다. 구기자나

*Corresponding author. E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-8645, Fax: 82-33-250-7451

무(*Lycium chinensis* Mill)의 열매, 뿌리껍질, 잎을 각각 구기자, 지골피, 구기엽이라 하며, 항당뇨 효능 연구에서는 세 가지 모두 생쥐의 실험적 고혈당을 감소시키는 효과가 있음을 관찰할 수 있었고 이중에서 구기엽과 지골피의 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다(16). 구기자 에탄올 추출물은 acarbose보다 높은 α -glucosidase, α -amylase 저해활성을 나타냈으며, 정상 생쥐를 통해 식후 혈당증가를 저하시키고 GLUT4 발현을 역시 증가시킨다(17). 저자 등은 전보(18-20)에 동충하초, 지골피, 가시오가피 추출물이 당대사 관련 주요 효소들의 활성을 증가시켜 항당뇨 효과를 나타냄을 보고한 바 있다. 한편, Ko 등(21)은 홍삼, 가시오가피, 동충하초 혼합 수엑스의 항당뇨 효능은 단독엑스보다 우수한 혈당강화 활성을 나타내어 세 시료간의 협동작용의 결과를 보고하였다. 그러나 이들의 작용기전에 대해서는 거의 알려지지 않고 있다.

고포도당은 생체 내 여러 신호전달계에 변화를 일으킨다. Bae 등(22)에 의하면 고포도당에 의해 증가되었던 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용은 인삼의 ginsenoside의 처리 시 차단되었으며, 아울러 고포도당에 의한 산화성 스트레스 증가, GSH 감소, arachidonic acid 방출 증가 작용 및 PGE₂ 합성 증가 작용은 현저하게 차단되었다고 하였다. Jung 등(23)은 ginsenoside가 고포도당에 의한 cAMP 및 PKC 활성 작용을 억제시켜 당뇨병성 신증의 발병을 억제한다고 말해 주고 있다. 고포도당은 해마 유래주 세포인 HT22 세포에서 산화성 스트레스 증가, lactate dehydrogenase 활성 증가 및 세포 사멸을 유도하였고 이러한 반응은 인삼 사포닌 처리 시 완벽하게 차단되어 항당뇨 신경증 효과를 나타낼 것으로 추측하였다(24). 반면 고포도당 조건에서는 PPAR- α agonist인 rosiglitazone이 malonyl-CoA decarboxylase 효소 활성에 영향을 끼치지 못했다고 하여 병리적 조건에서 지방산 산화 등과 밀접한 상호관련이 없었다고 하였다(25). 이상과 같이 고포도당 조건에 의한 천연 소재의 대사 과정을 이해하는 것은 천연 물질의 약리활성을 이용하는데 매우 중요하다. 그러나 이에 대한 연구는 극히 제한적이며, 특히 세포내 당 이용을 증가시킬 수 있거나 당 흡수를 지연시키는 당대사 관련 주요 효소들의 활성 능력을 검토한 연구는 전무한 실정이다.

HepG2 세포를 이용하여 대사성 증후군인 당뇨, 비만에 대한 연구가 보고되고 있다. Nakamaru 등(26)은 당뇨 치료제인 AICAR을 HepG2에 처리한 후 AMPK의 활성증가를 보고하였고, Choi 등(27)은 잔대를 수종의 용매로 추출한 후 HepG2 세포에 처리하여 항비만과 항고지혈증 효능을 보고하였다. HepG2 세포는 인간 hepatoma cell line으로 일반 hepatocyte의 기능을 모두 가지고 있고 증식률이 빠르기 때문에 간 대사 연구자가 매우 선호하는 세포이다. 본 연구의 목표인 고포도당의 병적상태에서 실험을 진행하기엔 정상 세포의 경우 세포사멸에 의해 3~4일 밖에 살지 못하고 시간이 지남에 따라 효소의 활성이 변하는 단점이 있으므로 재현

성이 높고 유지관리가 편리하며 세포가 무한증식하게 되는 HepG2 세포를 사용하였다.

본 연구에서는 지골피, 동충하초, 가시오가피를 일정비율로 혼합한 복합추출물을 고포도당 조건에서 배양한 HepG2 세포에 처리하여 glucokinase(GK)와 acetyl-CoA carboxylase (ACC) mRNA 및 단백질 발현의 변화를 RT-PCR, western blotting 등의 실험을 통해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 지골피, 동충하초, 가시오가피는 2008년 춘천시 소재 건재상에서 국내산 시료로 구입하여 정선, 수세 후 분쇄기로 균일하게 분쇄하여 냉장보관하면서 이용하였다.

추출물의 제조 및 비율

각 시료는 정선, 건조하여 완전히 분쇄한 후 10.7배 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 동안 교반하면서 유효성분을 추출하였다. 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 감압농축기(SB-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였고, 시료를 동결건조기(FD 8508, IIShin, Yangju, Korea)를 이용하여 -70°C에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 최종 농도 1 mg/mL이 되도록 조정하여 실험에 이용하였다. 기능성 소재의 항당뇨 활성을 상승시킬 수 있는 제품 개발의 일환으로 지골피, 동충하초, 가시오가피 물 추출물을 1:3:3 비율로 혼합하여 복합물을 제조하였고, 이를 분석에 이용하였다.

HepG2 세포주의 배양

인간 간암 세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. HepG2 세포는 고포도당(4.5 g/L) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

세포 생존율

세포 생존율은 Chung 등(28)에 의한 MTT(3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. HepG2 세포를 96-well plates에 1×10^6 cells/mL 농도로 100 μ L씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가되지 않은 배지에 각각의 지골피, 동충하초, 가시오가피 물 추출물을 농도별(0, 100, 250, 500, 1000, 2000 μ g/mL)로 제조한 후 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 DMEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액(5 mg/mL)을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 따라 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. 그런 다음 암 조건에서 30분

간 건조한 후 DMSO를 100 μ L씩 분주하여 1시간 동안 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

HepG2 세포를 6-well plates에 1×10^6 cells/mL 분주하여 24시간 동안 배양한 후 복합물을 처리하였고 24시간 동안 더 배양하였다. 복합물이 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis buffer를 각 well에 500 μ L씩 분주하여 세포를 lysis한 후 -70°C 에 보관하였다. 보관된 시료를 실온에서 녹인 후 chloroform 200 μ L를 분주하여 15초간 혼합하였다. 그 후 $12,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 isopropanol 500 μ L이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 $12,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 75:25로 섞어 만든 75% ethanol을 각 튜브에 1 mL 분주하여 $12,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 μ L씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 μ L에 0.1% DEPC를 955 μ L 첨가하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 total RNA양을 정량하였다.

First-stand cDNA를 합성하기 위하여 SuperScript III reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. Oligo(dT)₁₅ primer(500 μ g/mL) 1 μ L, dNTP mix(10 mM) 1 μ L, 추출한 RNA 2 μ g와 RNase free water로 11 μ L을 맞추고 65°C 에서 5분간 반응시킨 후 5배 first-stand 완충용액 4 μ L, nuclease free water 1 μ L, DTT(100 mM) 2 μ L, SuperScript III reverse transcriptase 1 μ L를 섞어 9 μ L씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C 에서 50분, 70°C 에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 GK-F-5'-CTG GAC GAC AGA GCC AGG AT, R-5'-TCA CCA TTG CCA CCA CAT CCA T; ACC-F-5'-GAT GTA CAT CGG CTG AGT GA, R-5'-ATC CAT TCA TTA CAT TGA CC를 사용하였으며, 내부 표준 유전자로 사용한 18S는 F-5'-GAG CCT GAG AAA CGG CTA C, R-5'-CCC ATT ATT CCT AGC TGC G를 사용하였다.

RT-PCR

당대사 관련 주요 효소들의 유전자 발현량을 측정하기 위하여 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. GoTaq Green Master 10 μ L, nuclease free water 8 μ L, forward primer(15 μ M)와 reverse primer(15 μ M)를 각각 0.5 μ L, 합성한 first-stand cDNA 1 μ L를 PCR tube에 넣은 후 PCR를 실행하였다.

GK PCR 조건은 94°C 에서 4분(1 cycle), 94°C 에서 30초, 50°C 에서 30초 그리고 72°C 에서 30초(44 cycles), 72°C 에서 5분(1 cycle)이었고, ACC PCR 조건은 94°C 에서 4분(1 cycle), 94°C 에서 30초, 47°C 에서 30초 그리고 72°C 에서 30초(25 cycles), 72°C 에서 5분(1 cycle)이었다. 내부표준 유전자인 18S PCR 조건은 95°C 에서 3분(1 cycle), 95°C 에서 30초,

55°C 에서 30초 그리고 72°C 에서 30초(25 cycles), 72°C 에서 5분(1 cycle)이었다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동한 후 자외선 광으로 유전자 발현정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel(Jandel Scientific, San Rafael, USA) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

Western blot

HepG2 세포를 6-well plates에 1×10^6 cells/mL로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 혼합 복합물을 처리하여 24시간 동안 더 배양한 다음 lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 이용하여 4°C 에서 용해시킨 후 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4°C) 하여 얻은 단백질 농도를 측정하였다. 동일한 양의 단백질(30 μ g)과 β -mercaptoethanol를 포함한 sample buffer를 1:2로 혼합한 후 100°C 에서 3분간 끓였다. 그 단백질은 Bio-Rad mini-gel system를 이용하여 SDS-PAGE 후 하나는 Coomassie Brilliant Blue G-250(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 염색하였고, 다른 하나는 nitrocellulose membrane(0.45 μ m, PROTAIN nitrocellulose transfer membrane, Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH, USA)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% 탈지분유를 함유한 Tris-buffered saline(TBS)에 1시간 동안 반응시킴으로써 blocking 하였다. 그 후 1차 antibody(GK, Santa Cruz Biotechnology, Sanra Cruz, CA, USA; ACC, Epitomics, Burlingame, CA, USA)가 첨가된 용액에서 상온에서 1시간 동안 혼합한 후 TBST(TBS containing 0.1% tween-20)로 5분간 3차례에 걸쳐 세척하였다. 그런 다음 membrane은 2차 Goat anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase antibody(Santa Cruz Biotechnology)가 첨가된 용액을 넣고 상온에서 1시간 동안 혼합한 후 5분 단위로 3차례에 걸쳐 세척하였다. 발색은 enhanced chemiluminescence method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다. 밴드의 강도는 SigmaGel 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다. 내부표준 단백질은 α -tubulin(Santa Cruz Biotechnology)을 사용하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad In-Stat(GraphPad InStat Version 3.0, 2003) 통계 package를 이용하여 평균 \pm 표준오차로 나타내었고, 대조군과 처리군의 통계적 유의성을 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

세포 생존율

지골피, 동충하초, 가시오가피 복합추출물의 항당뇨 활성

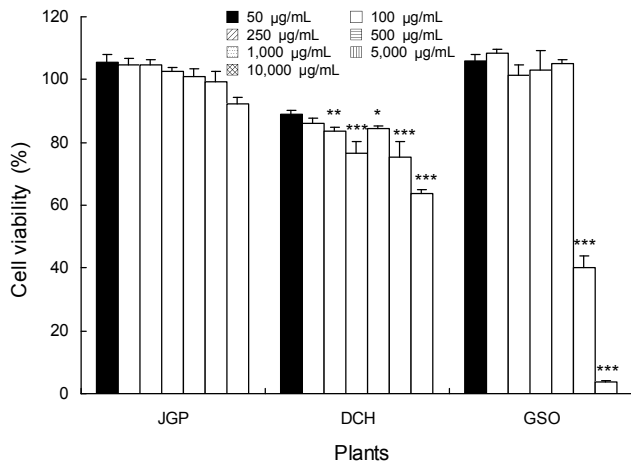


Fig. 1. Effect of *Lycii cortex* (JGP), *Cordyceps militaris* (DCH), *Acanthopanax senticosus* (GSO) against high glucose-induced cell viability in HepG2. Values are mean±SE. *p<0.05 vs. control, **p<0.01 vs. control, ***p<0.001 vs. control.

을 측정하기 위해 간암세포인 HepG2 세포주에 대한 세포독성을 MTT assay를 통해 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 지골피는 모든 농도에서 무처리군과 비교한 결과 변화가 없거나 증가하였으며, 동충하초는 무처리군과 비교한 결과 0.05, 0.1 mg/mL을 제외한 모든 처리군에서 세포독성을 나타내었다. 가시오가피는 고농도인 5, 10 mg/mL에서 무처리군과 비교하였을 때 세포독성이 있었으며, 저농도 처리 시에는 변화가 없거나 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 세포내 GK, ACC의 효소활성을 측정하기 위한 복합추출물의 농도를 지골피 10 mg/mL, 동충하초 0.1 mg/mL, 가시오가피 1 mg/mL로 결정하여 1:3:3 비율로 혼합하였다.

HepG2 세포에서 glucokinase mRNA, protein 발현

고포도당(4.5 g/L) 조건에서 배양한 HepG2 세포에 지골피, 동충하초, 가시오가피 복합추출물을 처리한 후 GK mRNA와 protein 발현 정도를 알아본 결과는 Fig. 2, 3에 나타내었다. 고포도당 조건에서 배양한 HepG2 세포에 복합추출물을 처리하였을 때 GK mRNA와 protein은 고포도당 배지 무처리군에 비해 168±0.04%, 182.4±0.03%로 발현량이 유의적으로 증가하였다(p<0.001).

GK는 해당 작용의 첫 단계 주요 조절 효소로서 glucose를 glucose-6-phosphate로 전환하여 세포내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시킨다(29,30). 또한 췌장의 베타세포와 간세포에 존재하여 간세포 내에서 포도당 대사를 조절하며(31), 췌장의 베타세포에서 혈중 포도당을 인지하여 인슐린 분비를 조절하는 포도당 감지 기구로서 작용한다(32). 현재 당뇨병과 GK의 활성 연관성에 대한 연구는 많이 보고되고 있으며(29,32,33), Pari와 Rajarajeswari(34)는 2형 당뇨를 인위적으로 유발시킨 후 cumarin(100 mg/kg)을 섭취시킨 흰쥐의 간에서 당대사 관련 주요 효소들의 활성을 측정된 결과 정상 쥐는 hexokinase(HK)의 활성 변화가 없었지만 당뇨를 유발

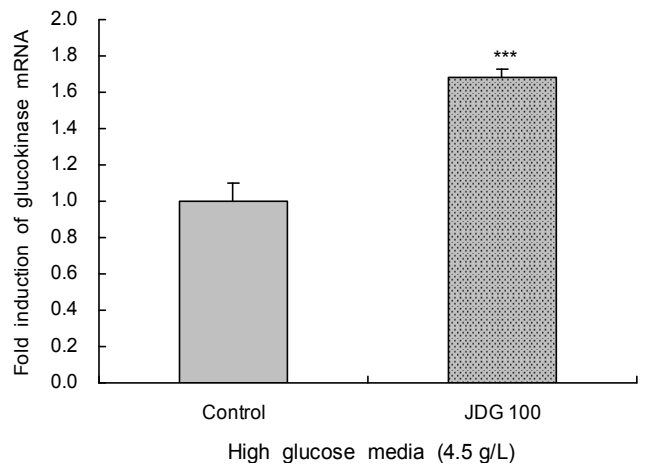


Fig. 2. Effects of JDG 100 against high glucose-induced expression of glucokinase mRNA in HepG2 cells. Values are mean±SE of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at ***p<0.001.

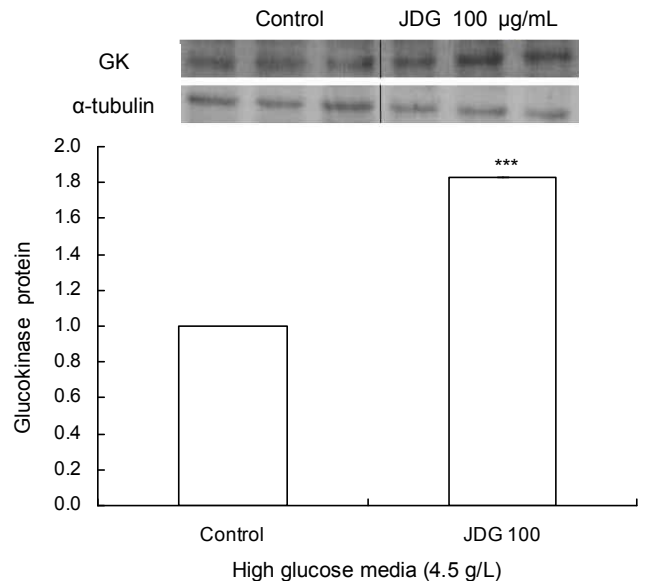


Fig. 3. Effects of JDG 100 against high glucose-induced expression of glucokinase protein in HepG2 cells. Values are mean±SE. Significant differences were compared with control at ***p<0.001.

시킨 후 cumarin을 섭취한 군에서 약 1.2배 활성이 유의적으로 증가하였고, Jung 등(29)은 감귤에 존재하는 hesperidin과 naringin을 지질 대사 및 당대사 관련 주요 효소들의 활성을 측정된 결과 GK는 대조군에 비해 유의적으로 증가하여 항당뇨 효능이 있다고 보고하였다. Kondeti 등(32)은 자단껍질을 정삼 쥐와 당뇨유발 쥐에 섭취시킨 후 간장내 당대사 관련 주요 효소들의 활성을 측정된 결과 당뇨유발군에서 glycolysis에 관여하는 GK의 활성은 증가하였으며, 정상군에서는 자단껍질을 섭취한 군이 대조군에 비해 활성이 감소하였고, gluconeogenesis에 관여하는 fructose-1,6-bisphosphatase는 당뇨를 유발시킨 쥐에서는 활성이 감소하였고 일반 쥐에서는 활성이 증가하였다고 보고하였다. Ko 등(35)

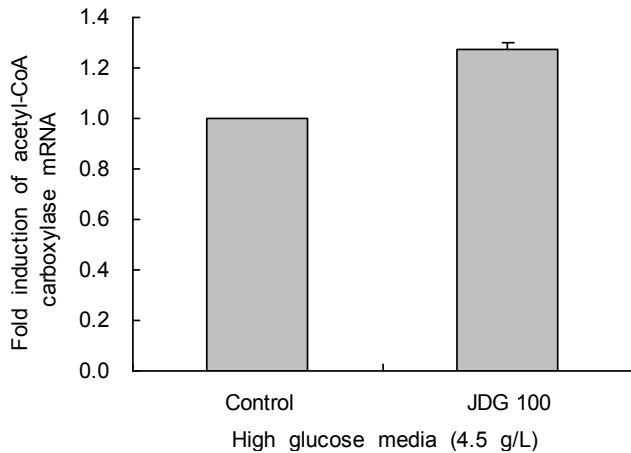


Fig. 4. Effects of JDG 100 against high glucose-induced expression of acetyl-CoA carboxylase mRNA in HepG2 cells. Values are mean±SE.

은 Min6 세포에서 길경 분획물이 GK mRNA 발현을 증가시켰다고 하여 본 연구와 유사한 경향이였으며, 이는 베타세포의 기능을 향상시켜 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 향상시켰기 때문이라 보고하였다. Kang 등(36)은 당뇨유발 백서의 간 조직에서 GK 효소의 활성 및 GK mRNA 발현은 정상 백서에 비하여 낮았으나 인슐린 투여 후 증가되었으며, 인슐린은 GK 효소 합성을 증가시키는 것으로 보고하였다.

이러한 관점에서 지골피, 동충하초, 가시오가피의 복합추출물이 GK mRNA 발현을 증가시켜 항당뇨 효과를 나타낼 수 있는 것으로 생각되며, 차후 복합추출물에 대하여 인슐린과 GK의 상관관계를 증명하기 위한 좀 더 심도 있는 연구가 진행되어야 한다고 판단된다.

HepG2 세포에서 acetyl-CoA carboxylase mRNA, protein 발현

고포도당 조건에서 배양한 HepG2 세포에 지골피, 동충하초, 가시오가피의 복합추출물을 처리한 후 ACC mRNA와 protein 발현 정도를 측정한 결과는 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. HepG2 세포에 복합추출물을 처리했을 때 무처리군과 비교하여 ACC 효소의 mRNA는 127.3±0.02%로 수치적으로 증가되었으며, protein 발현은 126.7±0.24%로 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.05).

ACC 효소는 pyruvate가 TCA cycle을 통해 에너지를 생성하고 잉여의 glucose를 지방으로 전환하는데 관여하는 효소로써 세포내로 들어온 glucose가 소모되는데 관여한다. 본 연구에서 ACC를 활성화시킨 지골피, 동충하초, 가시오가피의 복합추출물이 당뇨를 개선해 줄 것으로 사료된다. 한편, 최근 고지방 사료에 rosiglitazone과 fenofibrate를 섭취시킨 당뇨유발 쥐의 간과 근육조직에서 ACC mRNA 발현량 및 중성지방, 유리지방산이 대조군에 비교하였을 때 감소하였고 인슐린 민감성을 증가시켜 항당뇨 효능이 있다고 제시하였다(37). 따라서 천연소재 복합추출물이 다른 조직에서 ACC의 발현 정도 및 당뇨의 상관관계에 대한 좀 더 심도

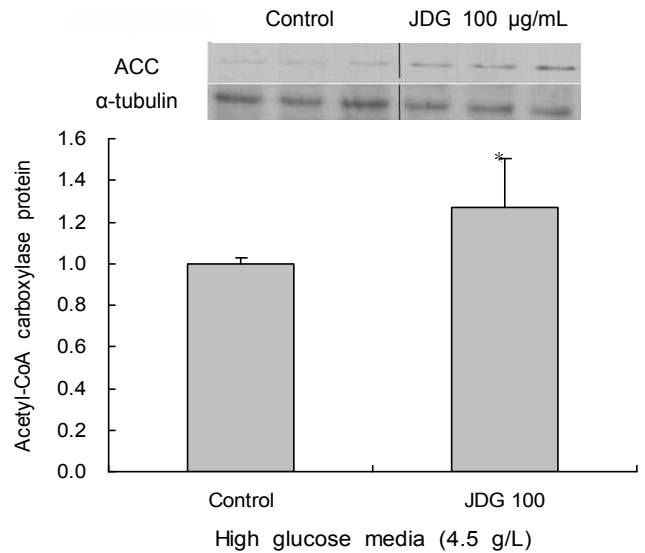


Fig. 5. Effects of JDG 100 against high glucose-induced expression of acetyl-CoA carboxylase protein in HepG2 cells. Values are mean±SE. Significant differences were compared with control at *p<0.05.

있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 지골피, 동충하초, 가시오가피의 복합추출물을 고포도당 조건(4.5 g/L)에서 배양한 HepG2 세포를 이용하여 당대사 관련 주요 효소인 glucokinase, acetyl CoA carboxylase의 활성을 RT-PCR과 western blotting 방법을 이용하여 측정하였다. 복합추출물을 HepG2 세포에 24시간 처리한 후 GK mRNA와 protein의 발현 양을 측정한 결과 각각 168±0.04%, 182.4±0.03%로 증가하였으며, ACC 효소의 활성은 고포도당으로 배양하였을 때 ACC mRNA 및 protein 발현 양은 각각 127.3±0.02%, 126.7±0.24%로 증가하였다. 결론적으로 지골피, 동충하초, 가시오가피의 복합추출물이 GK 및 ACC mRNA 발현을 증가시킴으로써 항당뇨 효과를 나타냄을 관찰하였다.

감사의 글

본 연구는 강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터, Nutraceutical Bio Brain Korea 21 및 강원의료융합인재양성센터의 일부 지원으로 수행한 연구입니다.

문 헌

1. Marle A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soell JS. 1985. *Joslin's Diabetes mellitus* 12th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA. p 251-277.
2. Moody CS, Hassan HM. 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci* 79: 2855-2859.
3. Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins AL. 1988. Starchy foods and glycemic index diabetes care. *Clin Diabetes* 11: 149-159.

4. Lebovitz HE. 1998. Postprandial hyperglycemic state: importance and consequences. *Diabetes Res Clin Pract* 40: 27-28.
5. Park JS, Seo GS, No JG, Cho IS, Park JH. 1995. Characteristics of the Gigolphy (*Lycii cortex Radicis*) wind. *Korean J Medicinal Crop Soc* 3: 128-134.
6. Takashi M, Sasaki H, Chin M, Sato T, Katayama N, Fukuyama K. 1987. Studies on the crude drug containing the angiotensin I converting enzyme inhibitors (I) on the active principles of *Lycium chinense* Mill. *Jap J Pharmacogn* 41: 169-173.
7. Kwon YM, Cho SM, Kim JH, Lee JH. 2001. Hypoglycemic effect of *Cordyceps militaris*. *Kor J Pharmacogn* 32: 327-329.
8. Kim MN, Oh SW, Lee DS, Ham SS. 2001. Antioxidative and antimutagenic effect of the ethanol extract from the effect of the *Cordyceps militaris*. *Korean J Postharv Sci Technol* 8: 109-117.
9. Cory JG, Suhadonik RJ, Resnick B, Rich MA. 1965. Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 103: 646-653.
10. Lee KH, Nam JO, Yoon WH. 2007. Effect of protein-bound polysaccharide isolated from *Acanthopanax senticosus* in reducing the toxic effect of cisplatin. *Korean J Pharmacog* 38: 1-17.
11. Brekhman II, Dardymov IV. 1969. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol* 9: 419-430.
12. Liu TP, Lee CS, Liou SS, Liu IM, Cheung JT. 2005. Improvement of insulin resistance by *Acanthopanax senticosus* root in fructose-rich chow-fed rats. *Clin Exper Pharmacol Physiol* 32: 649-654.
13. Choung ES, Park JP, Choi H, Jang GS, Kang SH, Kang SC, Zee OP. 2008. Effects of anti diabetic and GLUT4 gene expression of *Acanthopanax senticosus* extracts. *Kor J Pharmacogn* 39: 228-232.
14. Kim SD, Lee SI, Shin KO. 2005. Effect of *Acanthopanax senticosus* extracts on blood sugar and serum lipid profiles of streptozotocin-induced diabetic rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 549-557.
15. Ham SH, Lim BL, Yu JH, Ka So, Park BH. 2008. Fermentation increases antidiabetic effects of *Acanthopanax senticosus*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 22: 340-345.
16. Kim NJ, Youn WG, Hong ND. 1994. Pharmacological effects of *Lycium chinensis*. *Kor J Pharmacogn* 25: 264-271.
17. Hwang EY, Hong JH, Choi JH, Lee EJ, Lee IS. 2009. Study on anti-obesity and hypoglycemic effects of *Lycium chinense* Mill extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1528-1534.
18. Kim HS, Choe M. 2005. Hypoglycemic effect of *Paecilomyces japonica* in NIDDM patients. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 821-824.
19. Kim HS, Ro YJ, Choe M. 2005. Effects of *Cordyceps militaris* on key enzymes of carbohydrate metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1531-1535.
20. Kim DJ, Chung MJ, You JK, Seo DJ, Kim JM, Choe M. 2009. Effect of medicinal plant water extracts on glucose-regulating enzyme activities in Goto-Kakizaki rat liver cytosol. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1331-1335.
21. Ko SK, Kim JS, Choi YE, Lee SJ, Park KS, Chung SH. 2002. Anti-diabetic effects of mixed water extract from ginseng radix rubra, acanthopanax cortex, and cordyceps. *Kor J Pharmacogn* 33: 337-342.
22. Bae CS, Lim DS, Yoon BC, Jeong MC, Yoon KC, Park SH. 2008. Ginsenosides protect the high glucose-induced stimulation of IGFs in mesangial cells. *J Life Sci* 18: 23-29.
23. Jung HK, Lim SK, Park MJ, Bae CS, Yoon KC, Han HJ, Park SH. 2009. The protective effect of ginseng saponin against high glucose-induced secretion of insulin-like growth factor (IGF)-1 in primary cultured rabbit proximal tubule cells. *J Ginseng Res* 33: 26-32.
24. Lee JC, Jang SI. 2009. Ginsenosides prevent high glucose-induced apoptosis in HT22 cells. *Korean J Oriental Physiology Pathology* 23: 1019-1024.
25. Lee YJ, Zhao ZS, Kim SK, Kim HJ, Shim WS, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. 2006. Effects of PPAR- α and - γ agonists on fatty acid metabolism of muscle cells in hyperlipidemic and hyperglycemic conditions. *J Kor Diabetes Assoc* 30: 324-335.
26. Nakamaru K, Matsumoto K, Taguchi T, Suefugi M, Murata Y, Igata M, Kawashima J, Kondo T, Motoshima H, Tsuruzoe K, Miyamura N, Toyonagw T, Araki E. 2005. AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 449-454.
27. Choi HJ, Chung MJ, Ham SS. Antiobese and hypocholesterolemic effects of an *Adenophora triphylla* extract in HepG2 cells and high fat diet-induced obese mice. *Food Chem* 119: 437-444.
28. Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. 2005. Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 225-236.
29. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1134-1145.
30. Park SA, Choi MS, Kim MJ, Jung UJ, Kim HJ, Park KK, Noh HJ, Park HM, Park YB, Lee JS, Lee MK. 2006. Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Ethnopharmacol* 107: 412-417.
31. Matschinsky RM. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652.
32. Kondeti VK, Badri KR, Maddirala DR, Thur SKM, Fatima SS, Kasetti RB, Rao CA. 2010. Effect of *Pterocarpus santalinus* bark, on blood glucose, serum lipids, plasma insulin and hepatic carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 48: 1281-1287.
33. Oh SJ, Woo JT, Kim DY, Yang IM, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Choi YK. 1996. Mutations of glucokinase gene in Korean subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Korean J Med* 50: 344-355.
34. Pari L, Rajarajeswari N. 2009. Efficacy of coumarin on hepatic key enzymes of glucose metabolism in chemical induced type 2 diabetic rats. *Chem Biol Interact* 181: 292-296.
35. Ko BS, Kwon DY, Hong SM, Park SM. 2007. *In vitro* anti-diabetic effects of crude extracts of Platycodi radix. *Korean J Food Sci Technol* 39: 701-707.
36. Kang SY, Paeng JR, Seo KW, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW, Kim YS, Kim KW, Choi YK. 1994. Regulation of glucokinase gene expression and activity in the liver of diabetic rats. *Korean J Med* 47: 203-209.
37. Zhao Z, Lee YJ, Kim SK, Kim HJ, Shim WS, Ahn CW, Lee HC, Cha BS, Ma ZA. Rosiglitazone and fenofibrate improve insulin sensitivity of pre-diabetic OLETF rats by reducing malonyl-CoA levels in the liver and skeletal muscle. *Life Sci* 84: 688-695.