

Antidiabetic Activity of a Chloroform Fraction of *Vigna nakashimae* in *db/db* miceJeong-Su Nam<sup>1</sup>, Tae Joung Ha<sup>2</sup>, Jae Hong Park<sup>1</sup> and Myeong Ho Jung<sup>1\*</sup><sup>1</sup>School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 626-770, Korea<sup>2</sup>Department of Functional Crops, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang 627-803, Korea

Received February 19, 2013 / Revised March 27, 2013 / Accepted April 9, 2013

In this study, we evaluated the antidiabetic effect of a chloroform fraction of a methanol extract of *Vigna nakashimae* (designated VN) and compared it with that of a water fraction. Both fractions were administrated to eight-week old *db/db* mice for two weeks, after which the plasma glucose, triglyceride, and total cholesterol levels were measured. The chloroform fraction (VN-C) lowered the fasting glucose and blood glycosylated hemoglobin in the *db/db* mice more effectively than those of the water fraction (VN-W). VN-C also improved the glucose tolerance and led to a significant decrease in the plasma levels of free fatty acids and triglycerides. VN-C enhanced the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and increased the expression of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) in HepG2 and C2C12 cells more significantly than VN-W. Consistent with AMPK activation, VN-C inhibited cAMP/Dex-stimulated expression of gluconeogenic genes and increased glucose uptake in C2C12. Collectively, these results suggest that VN-C has an antidiabetic effect, which is exerted via AMPK activation, and that this effect is stronger than that of VN-W.

**Key words** : *Vigna nakashimae*, chloroform fraction, antidiabetic effect, AMP-activated protein kinase (AMPK), glucose uptake, gluconeogenesis

## 서 론

당뇨병은 내분비장애에 의한 질환 중 가장 흔한 형태로 그 원인에 따라 췌장의 베타세포 파괴에 의한 인슐린 결핍으로 발생하는 제1형과 인슐린 저항성 및 인슐린 분비장애로 발생하는 제2형으로 분류할 수 있다. 제2형 당뇨병은 포도당대사의 주된 장기인 간, 근육, 지방세포에 대한 인슐린작용의 저하(인슐린저항성, insulin resistance)가 주된 병인으로 여겨진다[3]. 현재 당뇨병 환자의 85% 이상이 제2형 당뇨병이며, 노령화와 생활습관의 변화로 인해 환자수가 꾸준히 증가하는 추세로 향후 당뇨병 환자가 인구의 10%에 이를 것으로 추정하고 있다[3]. 당뇨병은 고혈당 자체도 문제이지만 만성화될 때 동반되는 합병증이 보다 심각하며 고혈당이 지속됨에 따라 특징적인 혈관장애가 발생하는데, 보통 망막증, 신증, 신경장해의 3대 합병증이 나타나며, 그 외에 동맥경화에 의한 뇌경색, 심근경색, 폐쇄성동맥경화증의 위험율도 높고 기타 감염증에 걸리기도 쉽다[14].

세포내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소인 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 세포 내의 에너지가

감소하는 경우 즉 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에 활성화되어 ATP를 소비하는 과정 즉 지방산 합성과 콜레스테롤 합성을 억제하고 ATP를 생산하는 과정 즉 지방산 산화와 해당과정을 촉진한다[2]. 간에서 AMPK가 활성화되면 지방산과 콜레스테롤 합성을 억제하고 당 신생합성을 억제하는 반면 골격근에서 AMPK가 활성화되면 지방산 산화와 당 흡수가 촉진되며 지방세포에서는 지방분해와 지방생성을 억제한다. 또한 췌장 베타세포에서는 인슐린분비를 촉진한다. 그러므로 AMPK의 활성화는 제2형 당뇨병의 주요병인인 인슐린저항성을 개선하고 인슐린분비를 촉진시켜 줌으로 당뇨병 치료제 개발의 타겟이 된다[11, 13].

팥은 한자로 소두(小豆), 적두(赤豆), 홍두(紅豆)로 쓰이는 일년생 초본식물로 한국, 중국, 일본등지에서 재배되는 작물로 팥은 과거에는 암술머리와 초형 등의 형태적 특성에 의해 *Phaseolus*속으로 분류하였지만, 최근에는 검정녹두, 예팥 등과 함께 *Vigna*속으로 분류된다. 팥의 학명은 *Vigna angularis*로서 영명은 adzuki bean 또는 small red bean이며, *Vigna* 속의 대표적인 작물로는 팥(*Vigna angularis*), 녹두(mung bean), 동부(cowpea), 예팥(rice bean), 홍녹두(black gran) 등이 있다[7]. 팥은 매우 실용적인 잡곡으로 농업적으로 흉작기의 구황작물, 대과작물로서 중요한 단백질 식품원으로 이용되어 왔으며 특히 한국인의 식탁에서는 빼놓을 수 없는 기호성 작물로, 예로부터 팥죽을 비롯하여 떡, 빵, 과자 팥빙수등의 재료로 이용되어 왔다. 팥의 성분으로는 단백질, 지방, 탄수화물외에 미네랄류, 비타민등의 영양소와 사포닌이 들어있는데 주 성분은 단백질과 탄수화물이다. 팥은 비타민B가 풍부하기 때문에 각기

**\*Corresponding author**

Tel : +82-51-510-8468, Fax : +82-51-510-8437

E-mail : jung0603@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

예방에 효과가 있으며, 팔에 포함되어 있는 사포닌은 혈액 순환을 돕고, 이뇨 효과가 뛰어나며, 또한 팔의 항산화물질인 폴리페놀류는 고혈압, 고지혈증 등 혈액관련 증상을 개선하는 것으로 알려져 있다[8].

팔은 예로부터 당뇨병을 개선하는 것으로 알려져 왔는데, 팔에 대한 당뇨병 개선 연구가 최근에 보고되고 있다. *Vigna mungo* 에탄올 추출물이 당뇨 및 지질개선 효과가 있음이 보고 되었으며[10], *Vigna angularis* 에탄올 추출물 역시 당뇨동물인 KK-A(y)에서 항산화작용으로 혈당강하 효능이 있음을 보고 하였다[4]. 또한 *Vigna angularis* 열수 추출물이 STZ-mice에서  $\alpha$ -glucosidase 활성을 억제함으로써 식후혈당을 감소시킴을 보고하였다[5]. 최근에는 *Vigna nakashimae* 메탄올 추출물의 항당뇨효능을 제2형 당뇨병 질환모델인 *db/db* mice에서 규명 하였는데, *Vigna nakashimae* 메탄올추출물은  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 저해하여 식후 혈당과 공복혈당도 감소시켰으며 내당 능도 개선함을 보고하였다[12].

본 연구에서는 *Vigna nakashimae* 추출물이 공복혈당과 혈 중지질도 개선하였기 때문에,  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 억제 하는 것외에 인슐린저항성 및 지질개선 기능이 있을 것으로 판단되어, *Vigna nakashimae* 메탄올 추출물을 클로로포름 (chloroform)으로 추출하여 클로로포름 층 분획물과 물층 분 획물을 얻은 다음 이들 분획물에서 당뇨병 개선 효능을 측정 하고, 이에 관련한 분자적 기전을 제2형 당뇨병 질환모델인 *db/db* mice에서 연구하였다.

## 재료 및 방법

### VN 추출물 및 분획물 제조

실험에 사용한 VN (*Vigna nakashimae* IT178464)은 경남 밀 양시 소재 국립식량과학원에서 야생으로 재배한 것으로 6 kg 의 건조한 팔을 분말로 파쇄한 후 10 l의 80% 메탄올 (methanol)을 첨가하여 상온에서 3일 동안 두어 추출한 다음 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농 축 후 회전농축기로 농축하였다. 농축한 메탄올 추출물에 물 과 클로로포름을 넣고 진탕한 후 클로로포름 층에 녹아나오는 추출물을 5회 반복하여 추출하여 VN클로로포름층 분획물로 하고, 나머지 물층에 남아있는 추출물은 농축하여 VN물층 분 획물로 하였다.

### 세포배양 및 시약

골격근 세포주 C2C12와 간 세포주인 HepG2 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입 하여 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 으로 배양하였다. 세포 배양액인 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin/

penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR), cAMP, dexamethasone (Dex)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 pAMPK (Thr172), AMPK, glucose transporter 4 (Glut-4) 및 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa cruz, CA, USA)에서 구입하였고, pACC (Ser79)는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였다.

### VN 분획물의 항당뇨 동물실험

VN분획물의 항당뇨 효능을 알기 위해 7주령 수컷 C57BL/KsJ-*db/db* (*db/db*)와 Lean control 마우스를 (주)오리엔 트바이오를 통해 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)로부터 구입하여 일주일간의 적응기간 후, 체중과 공복혈당을 측정하 여 난괴법에 따라 당뇨대조군(*db/db*-control), VN 물층 분획물 300군(*db/db*-VN-W300: 300 mg/kg), VN 물층 분획물 500군 (*db/db*-VN-W500: 500 mg/kg), VN클로로포름층 분획물 300 군(*db/db*-VN-C300: 300 mg/kg), VN클로로포름층 분획물 500 군(*db/db*-VN-C500: 500 mg/kg), 그리고 정상대조군(lean-control)과 양성대조군 acarbose (*db/db*-acarbose)으로 나누어 2주 간 사육하였다. 모든 실험물질 및 양성대조물질은 매일 동일 한 시간에 경구투여하였으며, 정상대조군과 당뇨대조군은 물 을 경구투여하였다. 실험식은 AIN-76 조제식이(Central Lab. Animal Inc., Japan)를 공급하였고 물은 자유섭취시켰다. 2주 사육기간 동안 체중과 혈당의 변화를 알아보기 위해 0, 5, 10, 15일에 12시간 절식하여 체중을 측정한 후에 실험동물 의 꼬리를 자른 후 얻은 정맥혈을 이용해 공복혈당을 측정하 였다.

### 혈액 생화학적 인자 분석

실험동물의 희생시 모든 동물은 12시간 절식 후 에테르로 마취하여 복대정맥에서 혈액을 취해 혈청분리용 튜브와 EDTA가 처리된 튜브에 각각 나누어 담았으며, 혈청분리용 튜브의 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 얻 어 생화학적 분석을 위한 시료로 이용하였고, EDTA가 처리된 튜브의 전혈은 당화혈색소 함량을 측정하기 위해 사용하였다. 혈청 포도당과 지질대사의 생화학적 분석을 위해 각각의 kit를 아산제약(주)으로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### 포도당 부하 시험(Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)

각 실험군들의 포도당에 대한 내성을 알아보기 위해 투여 0, 5, 10, 15일째에 포도당부하 시험을 실시하였다. 실험동물은 12시간 절식한 후 공복혈당(0분)을 측정하고, 포도당(0.5 g/kg 체중)을 복강주사하여 30, 60, 120분째 꼬리 정맥혈을 이용해

혈당을 측정하였다.

Western blotting

단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 대상 단백질의 일차 항체 pAMPK, pACC, AMPK로 배양하고 membrane 수세 후 이차 항체로 한 시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system (FluoChem® FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 각 단백질의 발현을 분석하였다.

Glucose uptake 측정

C2C12 세포를 VN 분획물(100 µg/ml) 또는 AICAR(10 µg/ml)으로 미리 배양한 후 10 µM (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose) (2-NBDG)을 함께 첨가하여 2 시간 더 배양한 다음, 세포안으로 유입되는 2-NBDG을 형광으로 측정하였다.

RT-PCR

배양 세포의 총 RNA를 TRIzol (Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 추출한 후 NanoVueplus spectrophotometer (GE healthcare, WI, USA)를 이용하여 정량하고 SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 primer는 PEPCK; F (5'-GGTCCCAGGGTGCATGAAA-3'), R (5'-CACGTAGGGTG AATCCGTCAG-3'), G-6-Pase; F (5'-GGGAATTACCAAGA GCCC-3'), R (5'-GCCCATGGCATGGCCAGA-3'), carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1); F (5'-AATCCGAACATTCC GTACCC-3'), R (5'-GCAAATCTTCTGGCAAAC-3'), Actin; F (5'-GCCCTGAGGCACTCTCCA-3'), R (5'-GAAGGTAGT TTCGTGGATGCC A-3').

통계처리

실험의 결과는 mean±SE로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 One-way ANOVA, 평균값 사이의 차이는 Duncan's multiple-range test 를 통해 p 값이 0.05 미만(p<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

VN 추출물 및 분획물의 제조

본 실험에 사용한 VN 메탄을 추출물 및 분획물 제조는 재료 및 방법에서 설명한대로 수행하여, 6 kg의 VN으로부터 520 g의 메탄을 추출물 확보하였고, VN 메탄을 추출물로부터 클

로로포름층 분획물, 물층 분획물 각각 70.6 g, 402.2 g을 확보하여 실험에 사용하였다.

VN 분획물이 체중, 혈당에 미치는 영향

VN 분획물 투여기간 동안의 체중의 변화를 살펴보기 위해 투여 0, 5, 10, 15일째에 체중을 측정하였다. 당뇨병군 (db/db-control)과 비교하였을 때, VN-C500과 VN-W500 당뇨병 실험군에서 체중이 약간 감소함을 보여, VN 분획물이 당뇨병군에서 체중의 급격한 증가를 막아주는 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). VN 분획물이 혈당에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 투여 종료 후 복대정맥에서 채취한 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여 아산제약(주)으로부터 구입한 kit로 측정하였다. 정상대조군과 당뇨대조군을 비교하였을 때, 당뇨대조군이 유의성있게 혈당이 증가되었음을 볼 수 있었다(p<0.001). 양성대조군인 acarbose를 투여한 군은 유의성은 나타나지 않았지만 당뇨대조군에 비해서 혈당이 감소됨을 확인하였다. 물질 투여군 중에는 VN-C500과 VN-W500에서 당뇨대조군에 비해 혈당강하가 확인되었고, 특히 VN-C500군은 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮아졌다(p=0.001). 이러한 결과로서 VN 클로로포름층 분획물이 물층 분획물보다 혈당감소의 효과가 더 좋음을 알 수 있었다(Fig. 2).

VN 분획물이 당화혈색소 함량에 미치는 영향

실험종료 후, 복대정맥에서 전혈을 채취하여 당뇨병 치료효과를 판정하는데 중요한 지표로 사용되는 당화혈색소(HbA<sub>1c</sub>)를 측정하였다. 앞선 실험결과를 바탕으로 항당뇨 효과가 있다고 판단되는 VN-C500, VN-W500 군을 선별하여 측정하였다. 정상대조군에 비해 당뇨대조군에서 당화혈색소가 유의적

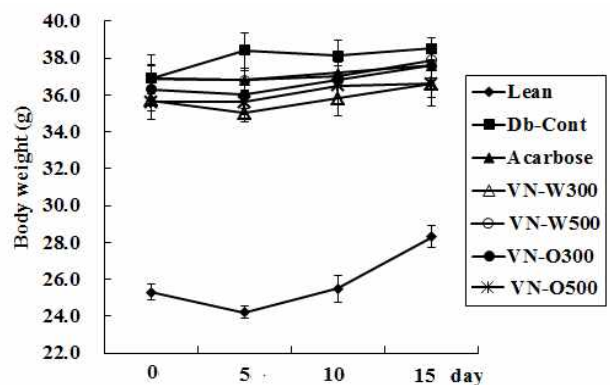


Fig. 1. Effects of *V. nakashimae* fractions on body weight in C57BL/KsJ-*db/db* Mice. Chloroform fraction (300 and 500 mg/kg, VN-C300, VN-C500) and water (300 and 500 mg/kg, VN-W300, VN-W500) fraction of *V. nakashimae* and acarbose (50 mg/kg of body weight) were administered daily to *db/db* mice for 15 day. Body weight were determined on the indicated days. Values are expressed as mean±SE, (n=7).

으로 증가되어 있는 것을 확인하였다( $p=0.013$ ). 실험군을 살펴 보면, acarbose군을 포함한 모든 실험군에서 당뇨대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 특히 VN-C500군이 당화혈색소를 가장 유의적으로 감소시켜, VN 분획물 특히 클로로포름층 분획물은 고혈당 상태를 개선시킴을 알 수 있었다(Fig. 3).

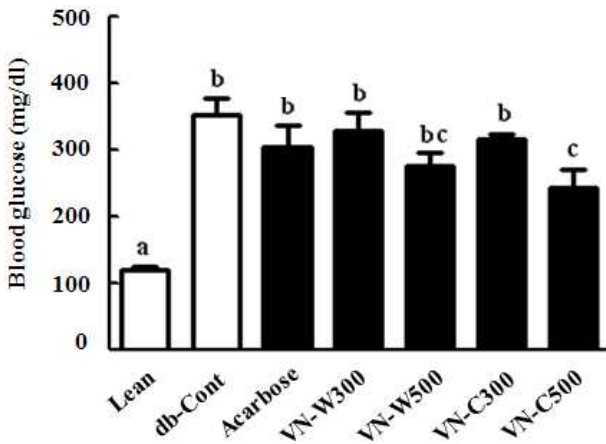


Fig. 2. Effects of *V. nakashimae* fractions on fasting blood glucose level in C57BL/KsJ-*db/db* Mice. Chloroform fraction (300 and 500 mg/kg, VN-C300, VN-C500) and water (300 and 500 mg/kg, VN-W300, VN-W500) fraction of *V. nakashimae* and acarbose (50 mg/kg of body weight) were administrated daily to *db/db* mice for 15 day. Blood glucose levels of fasted mice were determined on the indicated days. Values are expressed as mean±SE, (n=7). <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different ( $p<0.05$ ).

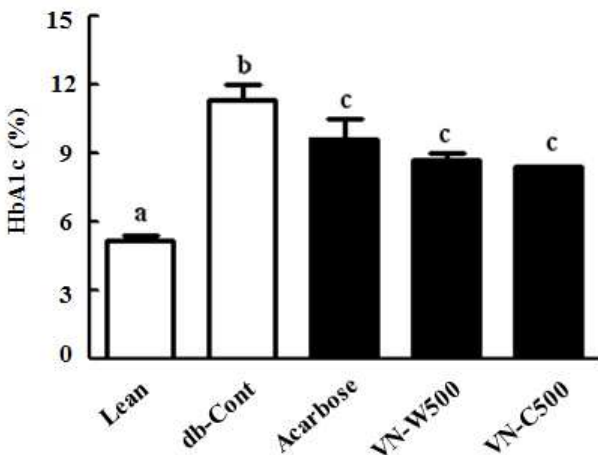


Fig. 3. Effects of *V. nakashimae* fractions on glycated hemoglobin A1c (HbA<sub>1c</sub>) in C57BL/KsJ-*db/db* Mice. After oral administration for 15 day, plasma glycated hemoglobin was determined. Values are expressed as mean±SE, (n=7). <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different ( $p<0.05$ ).

VN 분획물이 당대사에 미치는 영향

VN 분획물이 당대사에 미치는 영향을 살펴보기 위해 투여 0, 5, 10, 15일째에 IPGTT를 실시하였다. 당뇨대조군이 정상대조군에 비해 포도당 투여 후 120분째까지 초기혈당(0분)으로 회복되지 못하고 있음을 확인하였다. 양성대조군인 acarbose 군은 당뇨대조군에 비해 혈당 증가폭이 적었고 완만한 경사를 보였으나, 역시 초기혈당치로 회복되지는 못했다. 물질투여군을 살펴보았을 때, VN-C500, VN-W500 군은 당뇨대조군에 비해 포도당 투여후 혈당이 90분째까지 서서히 증가하여 120분째 혈당이 감소되는 경향을 보였다. 특히 VN-C500군은 공복혈당 감소, 당화혈색소 감소와 마찬가지로 당대사의 개선능이 가장 좋았다(Fig. 4).

VN 분획물이 혈중 지질에 미치는 영향

VN 분획물이 지질대사에 미치는 영향을 살펴보기 위해 혈중 중성지질과 총콜레스테롤 함량을 측정하였다. 먼저, 중성지질 수치를 살펴보면 당뇨대조군이 정상대조군에 비해 유의성은 나타나지 않았지만 수치가 증가되어있음을 확인하였다( $p=0.05$ ). 물질투여군에서는 VN-W300군을 제외한 모든 군이 당뇨대조군에 비해 혈중의 중성지질 수치가 감소되었다. 총콜레스테롤 함량은 정상대조군에 비해 당뇨대조군에서 유의적인 증가가 나타났다( $p=0.010$ ). 물질투여군 중 VN-C300, VN-C500, VN-W500 군은 당뇨대조군에 비해 수치가 감소되는 경향을 보이나, 양성대조군인 acarbose군과 VN-W300군에서는 오히려 당뇨대조군에 비해 수치가 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 VN 클로로포름 분획물은 지질대사를 개선시킴을 알 수 있었다(Fig. 5).

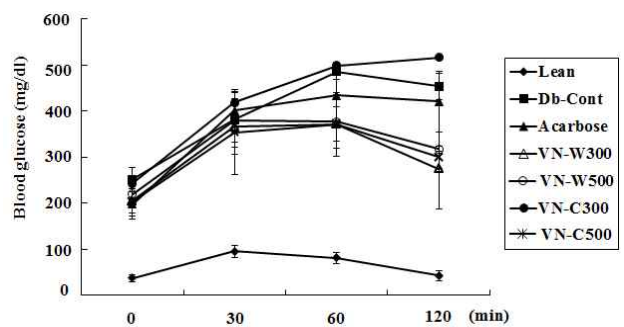


Fig. 4. Effects of *V. nakashimae* fractions on the intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in C57BL/KsJ-*db/db* Mice. One d before sacrifice, the mice were injected intraperitoneally with glucose (0.5 g/kg BW) after a 12-h fast. The blood glucose concentration was measured at the indicated times, and is presented as a percentage of the glucose injection zero time. Values are expressed as mean±SE, (n=7). <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different ( $p<0.05$ ). NS, not significant.

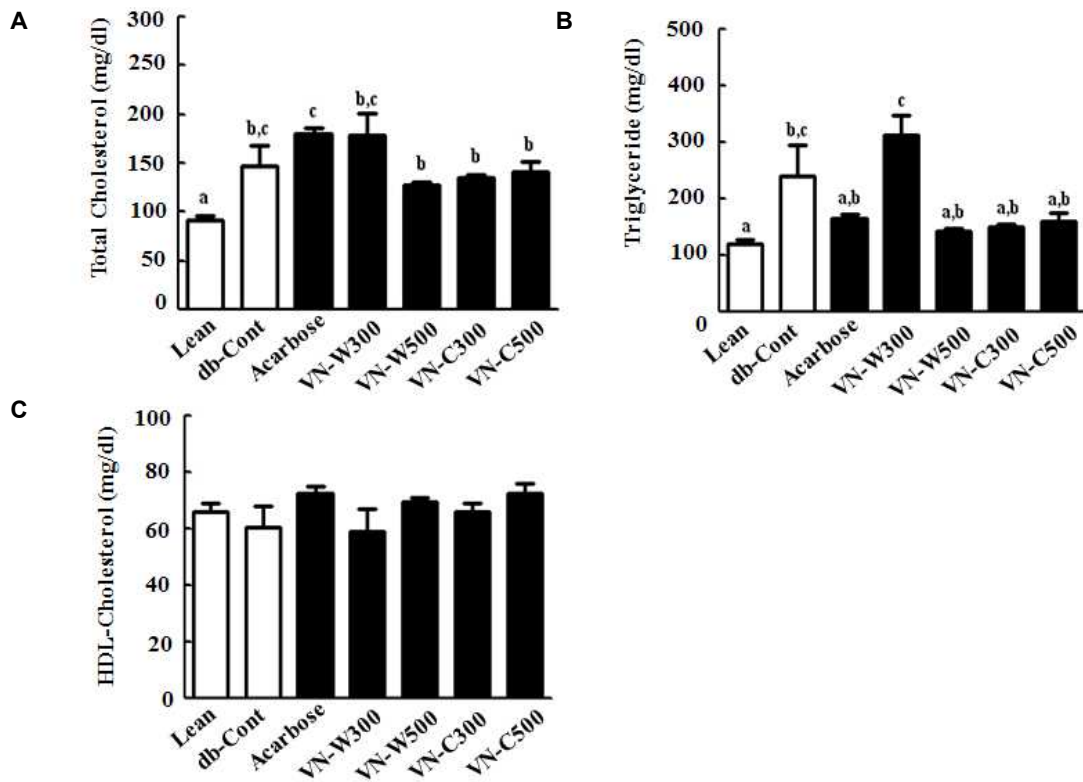


Fig. 5. Effects of *V. nakashimae* fractions on plasma lipid levels of *db/db* Mice. After oral administration for 15 day, plasma levels of total cholesterol, triglyceride, and HDL-cholesterol were determined. Values are expressed as mean±SE, (n=7). <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

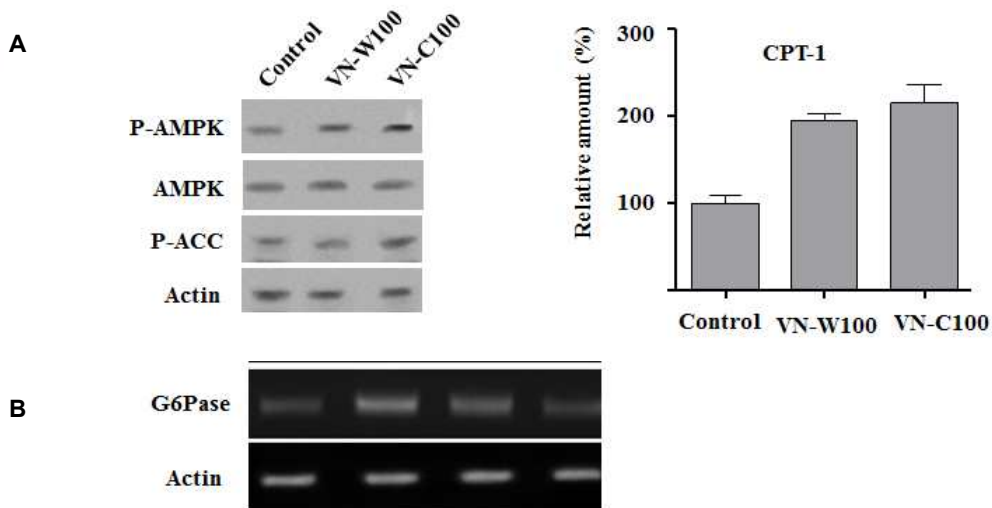


Fig. 6. Chloroform fraction of *V. nakashimae* activated AMPK and inhibited gluconeogenic gene expression in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with the fractions (100  $\mu$ g/ml) for 24 hr. Phospho-AMPK level was determined by western blot. CPT-1 expression was measured by RT-PCR. (B) HepG2 cells were incubated with 100  $\mu$ g/ml fractions in the presence of cAMP/Dex for 6 hr. The expression of PEPCK and glucose-6-phosphptase was determined by RT-PCR. Values are expressed as mean±SE, (n=3).

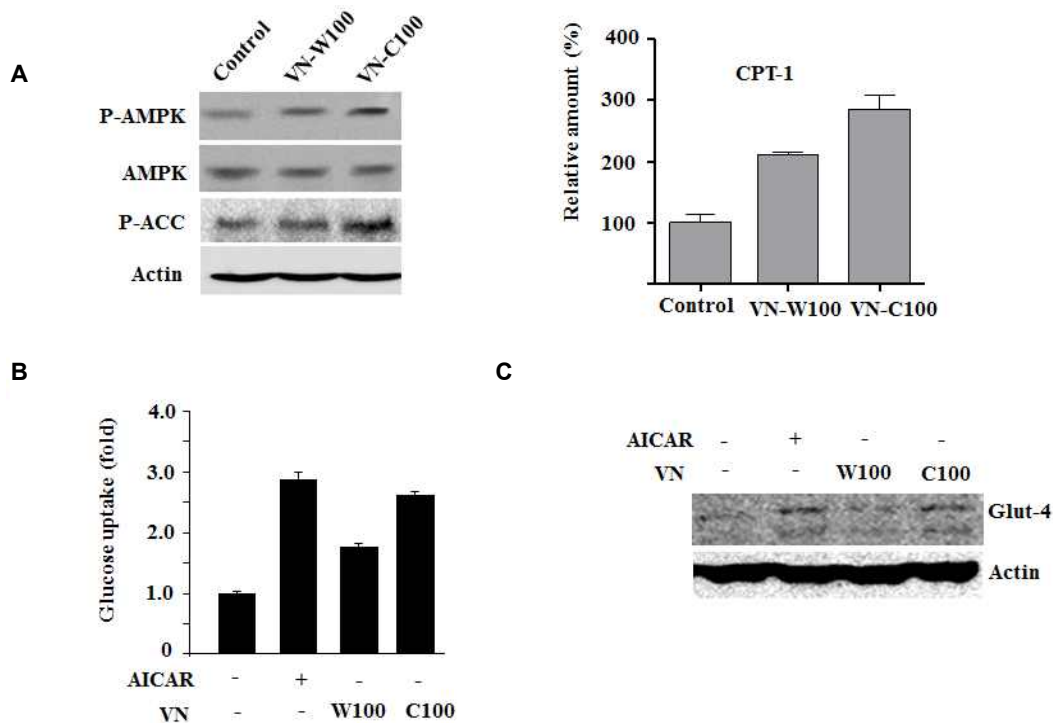


Fig. 7. Chloroform fraction of *V. nakashimae* activated AMPK and increased glucose uptake in C2C12 cells. (A) C2C12 cells were treated with 100  $\mu$ g/ml fractions for 24 hr. Phospho-AMPK level was determined by western blot. CPT-1 expression was measured by RT-PCR. (B) C2C12 cells were incubated with the fractions (100  $\mu$ g/ml) or AICAR (10  $\mu$ g/ml) in the presence of 10  $\mu$ M 2-NBDG for 2 hr, and then the fluorescence intensity was measured. Values are expressed as mean $\pm$ SE, (n=3). (C) C2C12 cells were incubated with the fractions (100  $\mu$ g/ml) or AICAR (10  $\mu$ g/ml) for 12 hr. The membrane fraction was isolated, and Glut-4 level was measured by western blot analysis.

#### VN 분획물의 AMPK 활성화와 당대사 영향

AMPK 활성화는 간에서 포도당 생성(gluconeogenesis)을 억제시키는 것으로 알려져 있으므로, VN 분획물의 공복혈당 강하에 관련된 기전을 알기 위해 간 세포 HepG2에서 AMPK의 활성화를 측정하였다. VN 분획물 모두 인산화된 AMPK를 증가시켰으며, AMPK의 하위 유전자인 carnitine palmitoyl-transferase-1 (CPT-1)의 발현도 증가시켰는데, 클로로포름층 분획물이 AMPK를 더 효과적으로 활성화시켰다(Fig. 6A). AMPK 활성화에 의해 당 생성이 영향을 받는지를 측정하였을 때, AMPK 활성화의 결과와 일치하게 클로로포름층 분획물이 가장 효과적으로 당 생성에 관련하는 효소인 PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) 또는 G-6Pase (glucose-6-phosphatase) 발현을 감소시켰다(Fig. 6B). 한편 AMPK 활성화는 골격근에서 당 유입(glucose uptake)을 촉진시켜 혈당을 감소시키는 것으로 알려져 있어, 골격근 세포인 C2C12에서 AMPK의 활성화와 당 유입을 측정하였다. VN 분획물 모두 인산화된 AMPK와 CPT-1의 발현을 증가시켰으며, HepG2에서와 같이 클로로포름층 분획물이 AMPK를 더 활성화시켰다(Fig. 7A). 당 유입을 측정하였을 때에도, 클로로포름층 분획물이 당 유입을 가장 많이 증가시켰다(Fig. 7B). 이러한

당 유입 증가가 당 수송체인 glucose transport-4 (Glut-4)의 세포막으로의 이동과 연관이 있는지를 알기 위해 세포막을 분리하여 Glut-4를 western blot으로 측정된 결과 당 유입의 결과와 일치하게 클로로포름층 분획물로 처리한 세포에서 Glut-4의 이동이 가장 많음을 알 수 있었다(Fig. 7C).

#### 고 찰

최근 팔은 건강기능성 식품으로 다이어트, 화장품, 미백비누, 피로회복제 등의 원료는 물론 천연색소 생산원료로서 새로운 수요가 늘어나고 있다. 특히 팔은 문헌 등을 통해 최근 사회적인 구조 변화와 식습관의 변화로 인해 급증하여 국민의 건강에 위협적인 비만, 당뇨병 대사성질환에 효과적인 식품으로 알려져 있으나 이에 대한 과학적인 효능 검증과 활성 물질이 규명되지 못함으로써 기능식품으로 개발되지 못하고 있다. 우리나라는 다양한 컬러색의 팔을 가지고 있어 색깔도 어두운 적색에서 밝은 적색 뿐 아니라 노란색, 황갈색, 녹색에 이르기까지 다양한 종파색을 가지고 있어, 시각적인 것은 물론 건강기능성 원료물질 개발면에서도 이용성이 크다고 볼 수 있다.

최근 팔에 대한 제2형 당뇨병 개선 연구가 보고되고 있는데, *Vigna mungo* 에탄올 추출물이 당뇨 및 지질개선 효과가 있음이 보고되었으며[10], *Vigna angularis* 에탄올 추출물 역시 당뇨 동물인 KK-A(y)에서 항산화작용으로 혈당강하 효능이 있음을 보고되었다[4]. 또한 *Vigna angularis* 열수 추출물이 STZ-mice에서  $\alpha$ -glucosidase 활성을 억제함으로써 식후혈당을 감소시키는 효과가 보고되었다[5]. 한국에서 야생으로 재배한 팥 품종 *Vigna nakashimae* 메탄올 추출물이 당뇨병을 개선시키는 제2형 당뇨병 질환모델인 *db/db* mice에서 규명되었는데, *Vigna nakashimae* 메탄올추출물은  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 저해하여 식후 혈당을 감소시켰다[12]. 그런데 *Vigna nakashimae* 메탄올추출물은 공복혈당과 혈중 지질도 유의적으로 감소시켰으며 내당능도 개선함을 보여, *Vigna nakashimae* 추출물에는  $\alpha$ -glucosidase을 저해하는 성분 이외에도 공복혈당 개선과 밀접한 연관이 있는 인슐린저항성을 개선하는 효능도 있을 것으로 판단되어, 본 연구에서는 *Vigna nakashimae* 메탄올 추출물을 다시 클로로포름으로 추출하여 농축한 클로로포름층 분획물과 물층 분획물을 이용하여 이들 분획물에 대한 당뇨병 개선 효능을 제2형 당뇨병 질환동물 *db/db* mice에서 비교 분석하고, 당뇨병 개선에 관련된 분자적 기전을 연구하였다.

VN 메탄올 추출물로부터 클로로포름으로 클로로포름층과 물층 분획물을 분리한 후, 제 2형 당뇨병 모델인 *db/db* mice에 2주 동안 식이하여 체중을 측정하였다. 500 mg/kg의 VN 분획물들은 당뇨병군에서 체중의 급격한 증가를 억제하는 효과를 나타내어 VN분획물에는 비만을 억제하는 효능도 있는 것으로 판단되었다. VN 분획물들의 공복혈당에 대한 영향은 측정하였을 때, 500 mg/kg 클로로포름층 분획물과 500 mg/kg 물층 분획물에서 당뇨대조군에 비해 혈당강하가 확인되었고, 특히 500 mg/kg 클로로포름층 분획물은 당뇨대조군에 비해 가장 유의적으로 혈당을 낮추어, 혈당감소 효과가 가장 좋았다. 당뇨병 치료효과를 판정하는데 중요한 지표로 사용되는 당화혈색소(HbA<sub>1c</sub>)을 측정하였을 때도, 500 mg/kg 클로로포름층 분획물이 당화혈색소를 가장 유의적으로 감소시켜 고혈당 상태를 개선시키는 효과를 알 수 있었다. 500 mg/kg 클로로포름 분획물은 공복혈당 감소, 당화혈색소 감소와 마찬가지로 포도당부하 검사에서도 당대사의 개선능이 가장 좋음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 500 mg/kg 농도의 VN 분획물들은 모두 혈당강하 및 내당능 개선 효능이 있었으나 클로로포름층 분획물이 더 효과적임을 알 수 있었다.

당대사 항상성은 간에서의 당 생성과 말초조직(근육, 지방 등)에서의 당 흡수 사이의 균형을 통하여 유지하게 된다. 당뇨병 환자에서의 간 혈당 증가는 공복 시 고혈당을 일으키는 주요 원인이 되는데[9], AICAR 또는 metformin과 같은 AMPK의 활성화 약물들이 간에서 당 생성을 억제시키므로 간에서의 당 생성 조절에 AMPK의 역할이 중요하다. AICAR를 처리하거나 AMPK-CA를 발현하는 간 세포에서 gluconeogenesis에

genesis에 관여하는 PEPCK 또는 G6Pase 유전자 발현이 감소되고, 이에 따라 당 생성이 억제됨이 보고되었다[1, 15]. 따라서 본 연구에서도 VN 분획물에 의한 공복혈당 강하에 AMPK 활성화와 관련이 있는지 알기 위해, 간 세포 HepG2에 VN 분획물을 처리하였을 때, VN 분획물들은 인산화된 AMPK를 증가시켰다. 특히 클로로포름층 분획물이 공복혈당강하의 결과와 일치하게 가장 많이 인산화된 AMPK를 증가시켰다. AMPK 활성화에 따른 당 생성 유전자들의 발현을 측정하였을 때에도 클로로포름층 분획물이 AMPK의 활성화와 일치하게 PEPCK와 G-6Pase의 유전자 발현을 가장 유의적으로 감소시켰다. 따라서 VN 분획물에 의한 공복혈당 강하는 간에서의 AMPK 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 클로로포름층 분획물이 더 효과적임을 알 수 있었다. 또한 근육은 생체 내의 당 흡수를 담당하는 기관으로 AMPK 활성화는 근육의 당 유입을 촉진시켜 혈당을 감소시키는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 골격근 세포에서도 VN 분획물이 AMPK 활성화를 통해 당 유입을 촉진하는지를 알기 위해, 골격근 세포 C2C12에 VN 분획물을 처리하였을 때, VN 클로로포름층 분획물이 AMPK를 가장 유의적으로 활성화시켰으며, AMPK 활성화와 일치하게 당 유입도 증가하였다. 이것이 Glut-4의 세포막으로의 이동에 의한 것인지를 알기 위해, 세포막 성분을 분리하여 Glut-4를 측정한 결과 클로로포름층 분획물로 처리한 세포에서 Glut-4가 가장 많이 존재하였다. 이상의 결과는 VN클로로포름층 분획물이 골격근에서도 AMPK를 활성화시켜 당 유입을 증가시켜 공복혈당 강하에 관여함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, VN 분획물은 공복혈당 및 당 내성을 개선시키는 효과가 있었는데, 분획물 클로로포름층 분획물이 물층 분획물보다 더 효과적이었다. 이러한 당뇨 개선의 효과는 간 및 골격근 세포에서 AMPK를 활성화시켜 간세포에서는 당 생성을 억제하고 골격근 세포에서는 당 유입을 증가시켜 공복혈당을 강하시킴을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

## References

- Bergeron, R., Previs, S. F., Cline, G. W., Perret, P., Russell, R. R., Young, L. H. and Shulman, G. I. 2001. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* **50**, 1076-1082.
- Carling, D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem*

- Sci* **29**, 18-24.
3. Goldstein, B. J. 2002. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *J Cardiol* **90**, 3G-10G.
  4. Itoh, T. and Furuichi, Y. 2009. Hypoglycemic effect of hot-water extract of adzuki (*Vigna angularis*) in spontaneously diabetic KK-A(y) mice. *Nutrition* **25**, 318-321.
  5. Itoh, T., Kita, N., Kurokawa, Y., Kobayashi, M., Horio, F. and Furuichi, Y. 2004. Suppressive effect of a hot water extract of adzuki beans (*Vigna angularis*) on hyperglycemia after sucrose loading in mice and diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2421-2426.
  6. Koistinen, H. A., Galuska, D., Chibalin, A. V., Yang, J., Zierath, J. R., Holman, G. D. and Wallberg-Henriksson, H. 2003. 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 1066-1072.
  7. Madar, Z. and Stark, A. H. 2002. New legume sources as therapeutic agents. *Br J Nutr* **88**, S287-292.
  8. Prinyawiwatkul, W., McWatters, K. H., Beuchat, L. R. and Phillips, R. D. 1996. Cowpea flour: a potential ingredient in food products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**, 413-436.
  9. Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.
  10. Solanki, Y. B. and Jain, S. M. 2010. Antihyperlipidemic activity of *Clitoria ternatea* and *Vigna mungo* in rats. *Pharm Bio* **48**, 915-923.
  11. Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G. and Gerich, J. E. 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **333**, 550-554.
  12. Yeo, J. Y., Ha, T. J., Nam, J. and Jung, M. H. 2011. Antidiabetic effects of *Vigna nakashimae* extract in db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 2223-2228.
  13. Zhang, B. B., Zhou, G. and Li, C. 2009. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* **9**, 407-416.
  14. Zimmet, P., Alberti, K. G. and Shaw, J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787.
  15. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. and Moller, D. E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167-1174.

초록 : db/db 마우스 동물모델에서 *Vigna nakashimae* 클로로포름층 분획물의 항당뇨 효능

남정수<sup>1</sup> · 하태정<sup>2</sup> · 박재홍<sup>1</sup> · 정명호<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 양산캠퍼스 한의학전문대학원, <sup>2</sup>국립식량과학원 기능성작물부)

최근 식생활의 변화에 따라 당뇨병, 비만 등의 만성대사질환의 발병률이 증가함에 따라 예방과 치료를 위한 물질연구가 많이 진행되고 있다. 본 연구에서는 선행 연구에서 항당뇨 효능이 확인된 *Vigna nakashimae* (VN) 메탄올 추출물로부터 VN 클로로포름층 분획물과 물층 분획물을 얻어 각 분획물의 항당뇨 효능과 분자적 기전을 살펴보았다. 각각의 VN 분획물을 제 2형 당뇨병질환모델인 *db/db* 마우스에 경구투여하여 VN 분획물의 혈당 및 지질 대사 변화 등을 측정하였다. VN 클로로포름층 분획물은 공복 혈당과 당화혈색소를 물층 분획물보다 더 효과적으로 감소시켰다. 또한 내당능도 개선하였으며, 혈중 지방산과 중성지방도 감소시켰다. VN 클로로포름층 분획물은 HepG2와 C2C12세포에서 인산화된 AMPK와 AMPK 하위 유전자인 CPT-1의 유전자 발현을 증가시켰다. VN 클로로포름층 분획물은 AMPK의 활성화와 일치하게 HepG2에서 당 생성 효소인 PEPCK와 G-6Pase의 발현을 감소시켰으며, C2C12에서는 당 유입을 증가시켰다. 이상의 결과는 VN 클로로포름층 분획물은 AMPK의 활성화를 통해 공복혈당을 감소시켰으며, 이러한 효과는 물층 분획물보다 더 효과적이었다.