

항당뇨 물질 Aloe QDM complex의 세포내 포도당 흡수촉진 효능

임선아¹ · 김기향¹ · 신은주² · 도선길² · 조태형² · 박영인³ · 이종길^{1*}

¹충북대학교 약학대학, ²(주)유니베라, ³고려대학교 약학대학

Effects of Antidiabetic Agent, Aloe QDM complex, on Intracellular Glucose Uptake

Sun-A Im¹, Ki-Hyang Kim¹, Eunju Shin², Seon-Gil Do², Tae Hyung Jo², Young-In Park³ and Chong-Kil Lee^{1*}

¹College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Univera Inc., Seoul 133-120, Korea

³College of Pharmacy, Korea University, Sejong 339-700, Korea

Abstract – Previous studies have shown that Aloe QDM complex, which is consisted of chromium (Cr), aloesin (ALS) and processed *Aloe vera* gel (PAG), exert antidiabetic activity in a high fat diet-induced mouse model of type 2 diabetes. In this study we examined the mechanism of the antidiabetic activity of the Aloe QDM complex. Rat myoblast cell line L6 cells were cultured in the presence of Cr, ALS, and PAG alone and in combinations, and then the capability of the cells to uptake glucose was examined using radiolabeled glucose. All of the 3 agents, Cr, ALS and PAG, exerted glucose uptake-enhancing activity in L6 cells. The most potent capability to uptake glucose was observed when L6 cells were cultured with the Aloe QDM complex. The activity of the Aloe QDM complex to enhance glucose uptake was prominent in conditions where existing insulin concentrations are low. We also examined the effects of the Aloe QDM complex on the plasma membrane expression of GLUT4 in L6 cells. The Aloe QDM complex increased the content of GLUT4 in the plasma membrane, while decreasing the content of GLUT4 in the light microsome. Taken together, these results show that the antidiabetic activity of the Aloe QDM complex is at least in part due to the stimulation of glucose uptake into the muscle cells, and this activity of the Aloe QDM complex is mediated through the enhancement of the translocation of GLUT4 into the plasma membrane.

Key words – Chromium, aloesin, Processed *Aloe vera* gel, Insulin, Glucose uptake, GLUT4

당뇨환자의 90% 이상을 차지하고 있는 제 2형 당뇨병은 다양한 병인, 즉 인슐린의 분비 이상, 말초조직에서 인슐린에 대한 내성, 간에서의 인슐린 내성 등이 연관된 복합성 질환으로 알려져 있다.¹⁾ 제2형 당뇨병은 초기단계에서는 골격근의 인슐린 저항성, 인슐린 과잉증이 나타나고 후기 단계에서는 간에서 포도당 신생, 고지혈증, dyslipidemia 등이 증가 된다.²⁻⁴⁾

현재 사용되고 있는 제2형 당뇨병의 경구 혈당 강하제로는 췌장에서 인슐린 분비를 촉진시키는 sulfonylurea 계열의 약물과 간에서의 포도당 분해와 당 신생을 억제하고 말초에서 포도당 수송을 증가시키는 biguanide 계열의 약물이 있으며, acarbose (α -glucosidase inhibitor)와 같이 장에서 포

도당 흡수를 저해하는 약물이 사용되고 있고, 경우에 따라 인슐린과의 병용요법도 시행되고 있다.^{5,6)} 최근에는 PPAR- γ 에 작용하여 말초에서 인슐린 작용을 민감하게 하는 것으로 알려진 thiazolidinedione 계열의 약물이 개발되어 현재 임상적으로 사용되고 있다.⁷⁾ 제 2형 당뇨병 치료 약물은 그 혈당강하 기전이 다양하나 주로 말초에서의 포도당 수송과 당대사의 개선이 중요하게 여겨지고 있으며, 특히 약물의 효능검색에 있어서 포도당 수송은 혈당강하 효과를 검색하는데 매우 유용한 실험 지표로 활용되고 있다.⁸⁾

저자 등은 식이 유도 비만 생쥐를 이용한 항당뇨 실험에서 *Aloe vera*의 gel에 함유되어 있는 다당체가 주성분인 processed *Aloe vera* gel (PAG)이 항당뇨 효능을 나타냄을 보고하였다.⁹⁾ 저자 등은 또한 PAG에 chromium (Cr) 및 aloesin (ALS)를 첨가한 조성물인 Aloe QDM complex는 식

*교신저자 (E-mail): cklee@chungbuk.ac.kr
(Tel): +82-43-261-2826

이 유도 비만 생쥐에서 PAG 보다도 더 강력한 항당뇨 효능을 나타냄을 보고하였다.^{10,11)} Aloe QDM complex가 PAG 보다 더 강력한 항당뇨 효능을 나타내는 것은 다른 연구자들의 연구 결과와 일맥상통하는 것이다. 왜냐하면, Aloe QDM complex는 식이 유도 비만 생쥐 모델에서 항당뇨 효능이 있는 것으로 이미 보고된 PAG에 항당뇨 효능이 있는 것으로 밝혀진 ALS 및 Cr을 첨가한 것이기 때문이다. ALS는 알로에에 함유되어 있는 chromone 성분으로 prediabetes/metabolic syndrome 환자에게 8주간 경구투여 했을 때 공복 혈당, 당화혈당 및 인슐린 저항성을 유의성 있게 감소시키는 것으로 확인된 바 있다.¹²⁾ 필수 미량원소인 Cr은 내당인자(glucose tolerance factor, GTF)의 활성 성분으로 내당능 장애 개선 효능이 알려져 있다.^{13,14)} Cr은 인슐린 수용체(insulin receptor, IR)의 수를 증가시키고,¹⁵⁾ IR tyrosine kinase의 활성을 증가시킴으로써 인슐린 저항성에 직접적으로 관여하는 것으로 보인다.¹⁶⁾ Aloe QDM complex의 항당뇨 기전으로는 인슐린 감수성 증강, 지방산 생합성 관련 효소의 발현 억제 및 비만 유도 염증성 사이토카인 생성 억제가 제시되었다.^{10,11)}

본 연구에서는 Aloe QDM complex의 작용기전 규명 연구의 일환으로 Aloe QDM complex 및 이를 구성하는 Cr, ALS 및 PAG이 근육세포주의 포도당 흡수에 미치는 영향을 조사하였고, Aloe QDM complex와 인슐린의 병용이 근육세포주 및 지방세포주의 포도당 흡수에 미치는 영향을 조사하였으며, 포도당의 세포내 흡수에서 가장 중요한 역할을 수행하는 GLUT4의 세포막 전이에 미치는 Aloe QDM complex 및 이를 구성하는 Cr, ALS 및 PAG의 효능을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용된 chromium chloride hexahydrate (CrCl₃, Cr)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였고, processed *Aloe vera* gel (PAG) 및 aloesin (ALS)은 (주)유니베라(서울)로부터 제공받았다. PAG의 제법 및 특성은 이미 보고된 논문에서 자세히 기술되어 있다.⁹⁾ Aloe QDM complex는 Cr, ALS 및 PAG의 혼합물이며, 저자 등이 식이 유도 비만 생쥐를 이용한 항당뇨 실험에서 사용한 Aloe QDM complex의 투여 용량(Cr 1 mg/Kg, ALS 2 mg/Kg, PAG 100 mg/Kg)에 기초하여 본 실험에서는 Cr은 1~2 µg/ml, ALS는 1~10 µg/ml, PAG은 10~100 µg/ml의 농도로 세포 배양액에 첨가하였다.^{10,11)}

세포의 배양 - 실험에 사용된 L6 세포와 3T3L-1 세포는 한국세포주은행으로부터 분양 받은 것이다. L6 세포는 24 well culture plate에 seeding 한지 2-3일째에 2% 우혈청(Hyclone, UT, USA)을 포함하는 배지(DMEM, Hyclone)로

교환한 후, 2일 후에 다시 한 번 배지를 교환하였다. 세포의 분화 정도를 매일 현미경으로 관찰하여 세포가 80-90% 이상 분화하였을 때(보통 7-8일 후) 실험에 사용하였다. 3T3L-1 세포는 24 well culture plate에 seeding 한지 2-3일째에 10% 우혈청이 들어있는 배지에 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich) 0.5 mM, dexamethasone (Sigma-Aldrich) 0.25 µM 및 인슐린 1 µg/ml (Roche, Germany)를 첨가하여 3일 배양한 후, 세척한 다음 다시 IBMX 0.5mM 및 dexamethasone 0.25 µM을 첨가하여 2일간 더 배양하여 분화시킨다. 현미경으로 관찰하여 세포가 분화된 것을 확인한 후(보통 분화시작 후 9-14일 경과된 것) 실험에 사용 하였다.

포도당 수송능 측정 - 포도당 수송능의 측정은 Chen 등이 기술한 방법으로 실시하였다.¹⁷⁾ 세포를 24-well culture plate (2×10⁴ cells/well) seeding하여 완전히 분화시킨 후, 시료를 농도별로 가하고 일정시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 미리 37°C로 가온한 pH 7.4의 HEPES-buffered Krebs-Ringer phosphate (KRPH)로 2회 세척하여 배지 안에 존재하는 glucose를 제거하였다. 각 well에 KRPH 375 µl을 가하고, [³H]-2-deoxyglucose (PerkinElmer) 25 µl을 가하여 0.5 µCi/ml이 되도록 하였다. 40분 후 [³H]-2-deoxyglucose을 포함하는 KRPH를 신속히 제거하고, ice-cold phosphate buffered saline (PBS)를 가하여 반응을 정지시켰다. Ice-cold PBS로 2회 더 세척한 후, 상온에서 잠시 방치하여 세포 표면의 물기를 완전히 제거한 다음 cell lysis buffer (0.5N NaOH)를 1 ml 가하고 overnight 처리하여 세포를 lysis 시켰다. 여기에 liquid scintillation cocktail (PerkinElmer, CT, USA) 4 ml을 가하여 liquid scintillation counter (Tri-Carb 2900TR, PerkinElmer, CT, USA) 로 radioactivity를 측정하였다.

세포막 Sheet의 분리 및 형광염색 - L6 세포를 2-well chamber slide (NUNC, NY, USA)에 2×10⁴ cells/well로 seeding 하여 완전히 분화시킨 후, 시료와 인슐린을 처리한 다음, ice-cold PBS로 2회 세척하였다. Chamber slide에 0.5 mg/ml의 polylysine이 함유되어 있는 PBS를 가하고 약 30초 방치 후, hypotonic buffer (23 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 3회 세척한 다음 ultra sonic microprobe로 chamber slide에 붙어있지 않은 부분의 세포막을 터트렸다. PBS로 세척한 다음, 터져서 노출된 세포막 내부를 형광물질 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 anti-GLUT4 monoclonal antibody (abcam, UK)로 염색하여 형광영상 분석시스템(ApoTom, ZEISS, Germany)으로 확인하였다.¹⁸⁾

포도당 수송체(GLUT4) 분리 및 측정 - GLUT4의 전이는 Chen 등이 기술한 방법으로 실시하였다.¹⁷⁾ 시료를 처리한 L6 세포를 취하여 4°C로 유지하며 cell pellet을

homogenizer로 균질화 시켰다. Homogenate를 원심분리 (750 g, 5분)하여 핵과 깨지지 않은 세포들을 제거한 후, 상등액을 원심분리(31,000 g, 60분)하여 pellet으로부터 crud plasma membrane (CPM)을 분리하였다. 이 상등액을 다시 원심분리(190,000 g, 60분)하여 pellet으로부터 light microsome (LM)을 얻은 후, -70°C에 보관하였다. L6 세포로부터 분리한 PM과 LM을 SDS-PAGE (10%)로 분리한 다음, PVDF membrane에 transfer 시켰으며, PVDF membrane은 Tris-saline-tween 20 (TBS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5)로 3회 세척한 후, blocking buffer (5% BSA을 함유하는 TBS)로 2시간 처리하였다. TBS로 3회 세척한 다음, 1:10,000으로 희석한 GLUT4에 대한 단클론항체(abcam, UK, isotype IgG)와 1 시간 동안 반응시킨 후, TBS로 15분간 3회 세척한 다음, 1:2000으로 희석한 horseradish peroxidase가 부착된 anti-rabbit IgG (abcam, UK)를 넣고 1시간 동안 흔들어 주었다. TBS로 3회 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare, UK)을 이용하여 image analyzer (Fusion Fx7, Vilber Lourmat)로 band를 확인하였다.

단백질 정량 - 단백질의 정량은 Pierce BCA protein

Assay Kit (Thermo, IL, USA)를 이용하였다. 96-well flat bottom plate에 시료 5 µl를 가한 후, alkaline copper tetratesilution 25 µl와 Folin reagent 200 µl를 가해 잘 섞고 15분 후에 ELISA reader (VerSa max, USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 표준품으로는 BSA를 사용하였으며, 단백질양은 3-5배 희석했을 때 0.2-1.5 mg/ml이 되도록 하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치±표준편차로 표시하였다. 대조군과 투여군에 대한 통계학적인 분석을 통해 유의성을 관찰한 후, 투여군간의 통계학적인 유의성을 검증하였다. 실험군간의 통계분석은 one-way ANOVA에서 유의한 점이 인정되는 경우 Tukey's t-test를 실시하여 통계학적 유의성을 판정하였다.

결 과

Cr, ALS, PAG 및 Aloe QDM complex가 L6 근육세포주의 포도당 흡수에 미치는 영향 - L6 근육세포주를 저우혈형 배지에서 배양하여 근육세포 유사세포로 분화를 유도한 후 Cr, ALS 및 PAG이 포도당 흡수에 미치는 영향을

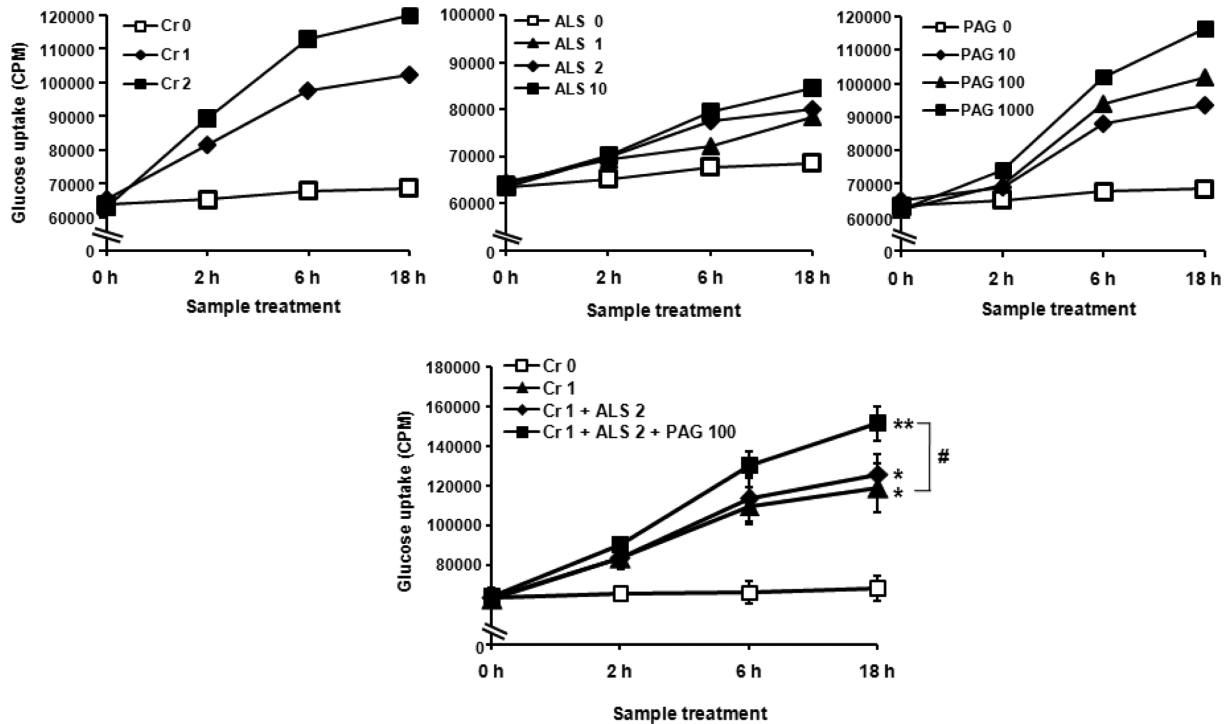


Fig. 1. Effects of Cr, ALS, and PAG alone and in combinations on glucose uptake in L6 cells. The cells were cultured in 24-well plates in the presence of the test materials for the indicated durations. The cells were washed with KRPH, and then the ability of the cells to uptake glucose was measured using 2-deoxy-D-[³H]-glucose (2-DOG, 3.2 µCi/nmol) for the final 20 min of the indicated culture period. Nonspecific uptake was measured in the presence of 100 µM phloretin and was subtracted from the total uptake. PAG 0, PAG 10, PAG 100, PAG 1000 mean 0, 10, 100 and 1000 µg/ml of processed *Aloe vera* gel. ALS 0, ALS 1, ALS 2 and ALS 10 mean 0, 1, 2 and 10 µg/ml of aloeisin. Cr 0, Cr 1 and Cr 2 mean 0, 1 and 2 µg/ml of chromium. *Significantly different from Cr 0 group ($P<0.01$). **Significantly different from Cr 0 group ($P<0.005$). #means $P<0.05$.

조사하였다. 즉, 분화된 L6 세포의 배양액에 시료를 농도별로 가하고 일정 시간(0, 2, 6, 18 시간) 배양한 후 배지를 제거하고 세척하여 glucose를 제거한 다음 [^3H]-2-deoxyglucose를 가하고 40분 동안 배양하여 [^3H]-2-deoxyglucose의 흡수량을 측정하였다. 그 결과, L6 세포에 Cr, ALS 및 PAG를 단독으로 가한 경우, 3개의 시료 모두에서 시료의 처리 시간이 18시간이었을 때 포도당 흡수도 가장 높으며, 처리 농도가 증가할수록 포도당 흡수를 증가시키나 농도 증가율 대비 포도당 흡수율의 증가는 크지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 1의 위 부분 그림). 즉, PAG의 경우, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 18시간 처리 시 101,000 CPM의 [^3H]-2-deoxyglucose 흡수를 보였으나, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 18시간 처리 시 116,000 CPM의 [^3H]-2-deoxyglucose 흡수를 보였다.

Cr, ALS 및 PAG의 혼합물이 L6 세포의 포도당 흡수에 미치는 영향을 전술한 실험과 마찬가지로 방법을 이용하여 조사하였으며, 그 대표적인 결과를 Fig. 1의 아래 부분에 보였다. 혼합물의 제조에 사용된 각 시료의 농도는 Cr은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ALS는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PAG은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도이며, 이는 저자 등이 식이 유도 비만 생쥐를 이용한 항당뇨 실험에서 강력한 항당뇨 효능을 나타낸 것으로 이미 보고한 Aloe QDM complex의 투여용량(Cr 1 mg/kg, ALS 2 mg/kg, PAG 100 mg/kg)을 시험관내 용량으로 환산 적용한 것이다^{10,11}). Fig. 1에 보인 바와 같이 Cr을 처리하지 않은 경우(약 70,000 CPM)와 비교하여 Cr을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 18시간 처리한 경우(약 118,000 CPM) [^3H]-2-deoxyglucose의 흡수가 현저히 증가되며($P<0.01$), Cr 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 ALS를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가할 경우에는 [^3H]-2-deoxyglucose의 흡수가 더 증가하나(약 123,000 CPM) Cr 단독에 비하여 유의성은 없고, Cr (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 ALS (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 PAG을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하면 [^3H]-2-deoxyglucose의 흡수가 현저히 더 증가됨(약 151,000 CPM)

을 알 수 있었다($P<0.005$). 이러한 결과는 Cr 단독 보다는 Cr, ALS 및 PAG의 혼합물인 Aloe QDM complex (Cr 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + ALS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PAG 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 L6 세포의 포도당 흡수를 현저히 촉진시킴을 입증하는 것이다.

Aloe QDM complex와 인슐린이 세포주의 포도당 흡수에 미치는 영향 - Aloe QDM complex 처리 시 인슐린의 존재가 근육세포주인 L6 세포 및 지방세포주인 3T3L-1 세포의 포도당 흡수에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 분화시킨 근육세포주 및 지방세포주에 Aloe QDM complex를 가하고 18시간 배양하였으며, 인슐린은 농도별(0.02, 0.2, 2 U/ml)로 배양 종료 2시간 전에 첨가하였다. 세포 배양액을 제거한 다음 세척 후, [^3H]-2-deoxyglucose의 흡수량을 전술한 방법으로 측정하였다. 그 결과, 인슐린은 L6 세포 및 3T3L-1 세포 둘 다에서 농도 의존적으로 포도당의 흡수를 증가시켰고, 세가지 농도의 인슐린 처리 그룹 모두에서 인슐린과 더불어 Aloe QDM complex를 병용 처리시 인슐린 단독 처리 시 보다 포도당의 흡수가 더 증가하였다(Fig. 2). Aloe QDM complex의 포도당 흡수 촉진 효과는 낮은 농도의 인슐린(0.2 또는 2 U/ml)이 존재하는 경우가 고 농도의 인슐린이 존재하는 경우 보다 더 강력하였다.

Aloe QDM complex와 인슐린이 포도당 수송체(GLUT4)의 전이에 미치는 영향 - Cr, ALS 및 PAG 단독 및 병용처리가 포도당 수송체 GLUT4의 세포막 전이에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에 사용한 GLUT4에 대한 단클론 항체는 세포막 안쪽에 존재하는 GLUT4 부분에 특이하게 반응하기 때문에 세포막 sheet를 먼저 분리하였다. 즉, chamber slide에 L6 세포를 부착시키고 시료를 처리한 후 ultra sonic microprobe로 세포막을 터트린 다음, 세척 후, slide에 부착되어 있는 세포막을 대상으로 형광물질이 부착된 GLUT4 특이 단클론 항체를 이용하여 염색하였다. 그 결과, 인슐린

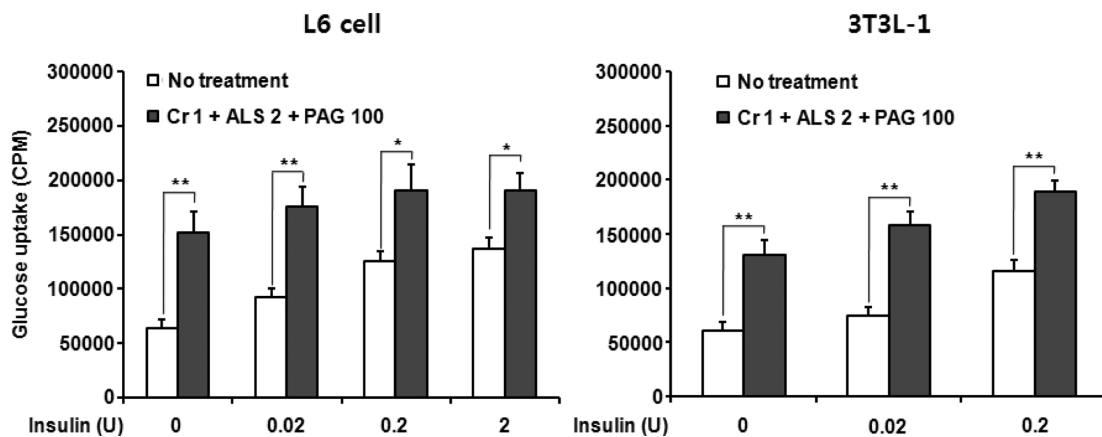


Fig. 2. Effects of Aloe QDM complex in the presence or absence of insulin on glucose uptake in L6 and 3T3L-1 cells. The cells were cultured in 24-well plates with aloe QDMC (PAG 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + ALS 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Cr 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 18 h. The indicated concentrations of insulin were added for the final 2 h of the culture period. Glucose uptake by the cells were measured as described in Fig. 1. * $P<0.05$. ** $P<0.005$.

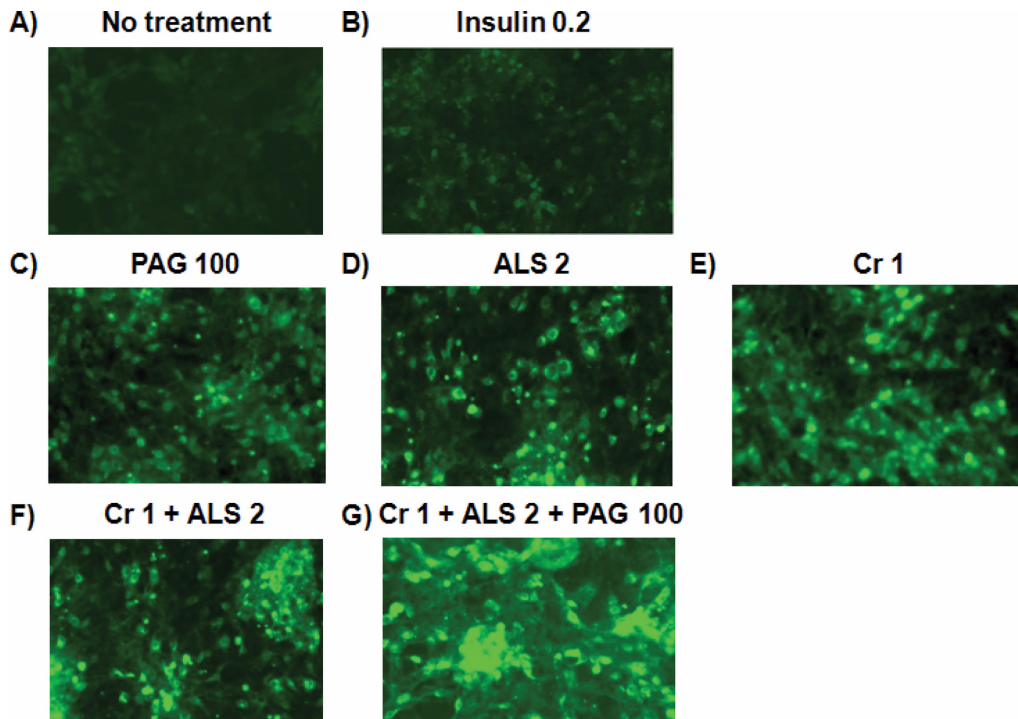


Fig. 3. Effects of Cr, ALS, and PAG alone and in combinations on GLUT4 translocation in L6 cells. L6 cells were cultured with the indicated concentrations of test materials in 2-well chamber slide for 18 h. Insulin (final concentration, 0.2 U/ml) was added for the final 2 h of the culture period. Plasma membrane sheets were prepared by the sonication method in a hypotonic buffer. Adherent plasma membranes were fixed in 2% paraformaldehyde and then stained with FITC-conjugated anti-GLUT4 monoclonal antibody. A: no treatment, B: 0.2 U/ml insulin only, C: PAG 100 µg/ml + 0.2 U/ml insulin, D: ALS 2 µg/ml + 0.2 U/ml insulin, E: Cr 1 µg/ml + 0.2 U insulin/ml, F: PAG 100 µg/ml + ALS 2 µg/ml + 0.2 U/ml insulin, G: PAG 100 µg/ml + ALS 2 µg/ml + Cr 1 µg/ml + 0.2 U/ml insulin.

Cr 1 µg/mL	-	-	-	-	○	○
ALS 2 µg/mL	-	-	-	○	-	○
PAG 100 µg/mL	-	-	○	-	-	○
Insulin 0.2 U	-	○	○	○	○	○
PM	[Western blot image showing GLUT4 bands in plasma membrane fractions]					
LM	[Western blot image showing GLUT4 bands in light microsome fractions]					

Fig. 4. Effects of CR, ALS, and PAG alone and in combinations on the subcellular distribution of GLUT4 in L6 cells. The cells were cultured in 24-well plates with the test materials for 18 h. Insulin (final concentration, 0.2 U/ml) was added for the final 2 h of the culture period. Subcellular membrane fractions of the L6 myotubes were prepared by ultra centrifugation after homogenation. The plasma membrane fractions (PM) and light microsome fractions (LM) were subjected to SDS-PAGE and western blotting using anti-GLUT4 monoclonal antibody. This photograph shows typical results of three independent experiments.

을 0.2 U/ml로 단독 처리한 경우도 GLUT4의 세포막 전이가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 인슐린(0.2 U/ml)과 더불어 Cr, ALS 또는 PAG을 병용처리 하였을 경우에는

GLUT4의 세포막 전이가 더 증가하였으며, Aloe QDM complex 처리시 GLUT4의 세포막 전이가 가장 강력하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3).

Cr, ALS 및 PAG 단독 및 병용처리가 세포내 GLUT4의 분포에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험에서는 시료를 처리한 L6 세포를 수확하여 lysis 시킨 다음, 세포막 분획(plasma membrane, PM) 및 가벼운 마이크로솜 분획(light microsome, LM)으로 나눈 후, 각 분획에 존재하는 GLUT4의 양을 GLUT4 특이 단클론 항체를 이용한 western blotting으로 측정하였다. 그 결과, 아무 시료도 처리하지 않은 그룹에서는 GLUT4는 대부분 LM 부분에 존재하나 인슐린, Cr, ALS 및 PAG 등이 자극에 의하여 PM 부분으로 전이됨을 확인하였고, GLUT4의 PM으로의 전이는 Aloe QDM complex가 가장 강력히 유도함을 확인할 수 있었다.

고 찰

식이 유도 비만 생쥐를 대상으로 수행한 실험에서 Aloe QDM complex는 우수한 항당뇨 효능을 나타낸 것으로 이미 보고되었으나, 그 작용기전은 아직 분명하게 밝혀지지

못하고 있다. 본 연구를 통하여 Aloe QDM complex는 근육세포는 물론이고 지방세포에서도 포도당의 흡수를 촉진시키며, 그 주요 작용기전은 포도당 수송체인 GLUT4의 세포막으로의 전이 촉진임을 확인하였다. 본 연구에서는 또한 Aloe QDM complex를 구성하는 Cr, ALS 및 PAG을 단독 또는 2 가지를 병용하여 근육세포주 및 지방세포주에 처리하는 실험도 수행하였고, 결과적으로 세포내 포도당 흡수 촉진 효능은 Aloe QDM complex가 가장 우수함도 입증하였다. Aloe QDM complex의 포도당 흡수 촉진 효능은 저농도 (0.02~0.2 U/ml)의 인슐린이 존재하는 조건에서가 고농도의 인슐린(2.0 U/ml)이 존재하는 조건에서 보다 더 강력하였다.

포도당의 세포내로의 흡수 연구에 사용한 L6 세포는 neonatal rat의 thigh 근육세포로부터 분리해 만든 myoblast로서 골격근에서의 당 수송능 측정 실험에서 흔히 사용되는 세포주이다. L6 세포는 myoblast 상태로 무한히 분열해 나가지만 일단 confluence 상태가 되면 multinucleated skeletal muscle myotubes로 분화하게 되고, 골격근의 형태적, 생리적 특징을 나타내게 되며, GLUT1 뿐만 아니라 GLUT4 발현이 증가되어 인슐린 반응성이 증가하게 되므로 인슐린 반응성 실험에 많이 사용된다.¹⁹⁾ 3T3-L1 세포는 지방세포에서의 당 수송 측정 실험에 흔히 사용되는 세포주이다. 분화된 3T3-L1은 전형적으로 single large lipid droplet을 가지는 성숙한 지방세포와는 달리 cytoplasm에 multiple lipid droplets를 갖고 있다.²⁰⁾ 3T3-L1세포는 isobutylmethyl xanthine, dexamethasone과 인슐린의 혼합액을 처리하면 분화되어 인슐린 수용체를 발현시키며, GLUT1 뿐만 아니라 GLUT4 발현이 증가되어 인슐린에 대한 반응성이 더욱 높아져 인슐린 반응성 실험에 흔히 이용된다.^{18,21)}

본 연구에서 사용한 PAG은 Aloe vera로부터 분리한 gel에 cellulase를 처리한 후, 활성탄 칼럼을 통과시켜 저분자 물질을 제거한 다음 건조시켜 분말화한 것이다.⁹⁾ PAG은 고지방식을 장기간 섭취하게 하여 사람의 제 2형 당뇨병과 가장 가까운 모델인 식이 유도 비만(diet-induced obesity, DIO) 생쥐를 유도한 후, PAG를 경구 투여한 결과 인슐린 저항성을 감소시킴으로써 혈당을 저하시켰으며, 간과 혈장의 중성지방 농도도 감소시켰다고 보고된 바 있다.⁹⁻¹¹⁾ 사실, 알로에의 항당뇨 효능은 1985년 Agarwal에 의해 처음 밝혀졌는데, Agarwal의 연구에 의하면 3167명의 당뇨병자에게 알로에 잎이 들어있는 규정식을 하루에 2번씩 5년간 섭취시켰을 때 혈당과 혈중 중성지방과 총 콜레스테롤이 현저하게 감소되었다.²²⁾ 이후로 당뇨 환자를 대상으로 알로에 성분들의 항당뇨 효능에 관한 연구들이 많이 진행되었으며,²³⁻²⁶⁾ alloxan과 streptozotocin으로 당뇨가 유도된 동물모델에서의 연구도 많이 진행되었다.²⁷⁻³¹⁾

ALS는 알로에 함유되어 있는 chromone 성분이며, 3%

dextran sulfate sodium이 함유된 음용수로 대장염을 유발한 쥐에 경구투여했을 때 항염증작용을 나타낸다고 보고되었으며,³²⁾ 단백질수준의 cyclin E/CDK2 복합체와 Cdc25A를 유도함으로써 cyclin E/CDK2 kinase의 활성을 증가시키는 과정을 통해 세포의 증식을 촉진시켜 손상된 간세포 치유효능을 나타내는 것으로 보고되었다.³³⁾ ALS는 또한 prediabetes/metabolic syndrome 환자에게 8주간 경구투여 했을 때 공복혈당, 당화혈당과 인슐린 저항성을 유의성 있게 감소시키는 것으로 확인되어 항당뇨 효능이 있는 것으로 보고되었다.¹²⁾

필수 미량원소인 Cr은 내당인자(glucose tolerance factor, GTF)의 활성 성분으로 rat의 저하된 내당을 회복시켰으며,³⁴⁾ 내당능장애가 있는 영양불량의 어린이에게 Cr을 경구 투여하면 Cr 결핍증으로 인한 내당능장애가 개선되었다고 보고되었다.³⁵⁾ 특히 Cr은 내당능장애의 초기 증상을 개선하는데 큰 효과가 있으며,³⁶⁾ 인슐린 비의존성 당뇨를 가진 노인을 대상으로 한 실험에서 Cr의 보충이 내당능장애를 개선하였다고 보고되었다.³⁷⁾ Cr은 인슐린 수용체(insulin receptor, IR)의 수를 증가시키고¹⁵⁾ IR tyrosine kinase의 활성을 증가시킴으로써 인슐린 저항성에 직접적으로 관여하는 것으로 보이지만,¹⁶⁾ 명확한 기전에 대해서는 아직 증명되지 못하고 있다.³⁸⁾

포도당 흡수는 세포내 포도당 대사과정에서 속도를 조절해 주는 과정에서 매우 중요한 역할을 한다. 각 조직으로의 포도당 흡수는 포도당 수송체(GLUT)라고 불리는 당단백질에 의해 일어나며, 여러 종류의 isoform이 밝혀져 있다. 포도당 수송은 현재 포도당 수송체의 발현, 내재활성, 세포막으로 전이에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다.³⁹⁾ 포도당 수송체 중 GLUT4는 주로 지방과 근육세포에 분포하며, 인슐린이나 운동과 같은 외부 반응에 의해 세포막으로의 전이가 일어나 포도당을 세포내로 수송하게 된다. 제 2형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 내성은 light microsomes에서 plasma membrane으로의 GLUT4 전이가 감소됨으로써 나타난다고 설명되기도 한다.⁴⁰⁾ 본 연구를 통하여 Aloe QDM complex는 근육세포 및 지방세포 대하여 포도당 수송체인 GLUT4의 세포막으로의 전이를 촉진함을 확인하였다.

결 론

Cr, ALS 및 PAG은 단독으로도 근육세포의 포도당 흡수를 촉진시키나, Cr, ALS 및 PAG을 혼합한 Aloe QDM complex는 근육세포의 포도당 흡수를 가장 강력히 촉진한다. Aloe QDM complex는 지방세포에 대해서도 포도당의 세포내 흡수를 촉진시킨다. Aloe QDM complex는 세포에 처리하는 시간이 길수록 증가된 포도당 흡수 촉진 효과를 나타내며, 약 18시간 동안 처리할 경우 포도당 흡수 촉진 효능이 가장 강력하다. Aloe QDM complex의 포도당 흡수 촉진

진 효능은 저 농도(0.02~0.2 U/ml)의 인슐린이 존재하는 조건에서가 고 농도의 인슐린(2.0 U/ml)이 존재하는 조건에서 보다 더 강력하다. Aloe QDM complex의 포도당 흡수 촉진 효능은 포도당 수송체인 GLUT4의 세포막으로의 전이 촉진인 것으로 보인다.

인용문헌

- Charles, M. A., Eschwege, E. and Bennett, P. H. (1997) Non-insulin-dependent diabetes in populations at risk : the Pima Indians. *Diabetes Metab., Suppl.* **4**: 6-9.
- American Diabetes Association (2002) Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **25**: S5-S20.
- Ferrannini, E. (1998) Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus : problems and prospects. *Endocr. Rev.* **19**: 477-490.
- Gerich, J. E. (1998) The genetic basis of type 2 diabetes mellitus : impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr. Rev.* **19**: 491-503.
- Krentz, A. J. and Bailey, C. J. (2005) Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* **65**: 385-411.
- Cheng, A. Y. and Fantus, I. G. (2005) Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ* **172**: 213-226.
- Abbas, A., Blandon, J., Rude, J., Elfar, A. and Mukherjee, D. (2012) PPAR- γ agonist in treatment of diabetes: cardiovascular safety considerations. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **10**: 124-134.
- Mueckler, M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**: 713-725.
- Kim, K., Kim, H., Kwon, J., Lee, S., Kong, H., Im, S.-A., Lee, Y. H., Lee, Y. R., Oh, S. T., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K. and Kim, K. (2009) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of processed *Aloe vera* gel in a mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Phytomedicine* **16**: 856-863.
- Kong, H., Lee, S., Shin, S., Kwon, J., Jo, T. H., Shin, E., Shim, K.-S., Park, Y. I., Lee, C. K. and Kim, K. (2010) Down-regulation of adipogenesis and hyperglycemia in diet-Induced obesity mouse model by Aloe QDM. *Biomol. Ther.* **18**: 336-342.
- Shin, E., Shim, K. S., Kong, H., Lee, S., Shin, S., Kwon, J., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K. and Kim, K. (2011) Dietary aloe improves insulin sensitivity via the suppression of obesity-induced Inflammation in obese mice. *Immune Netw.* **11**: 59-67.
- Devaraj, S., Yimam, M., Brownell, L. A., Jialal, I., Singh, S. and Jia, Q. Effects of *Aloe vera* supplementation in subjects with prediabetes/metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* DOI: 10.1089/met.2012.0066 [Epub ahead of print]
- Schwarz, K. and Mertz, W. (1959) Chromium(III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**: 292-295.
- Tuman, R. W. and Doisy, R. J. (1977) Metabolic effects of the glucose tolerance factor (GTF) in normal and genetically diabetic mice. *Diabetes* **26**: 820-826.
- Anderson, R. A., Polansky, M. M., Bryden, N. A. and Bhatena, S. J. (1987) Canary, J.J. Effects of supplemental chromium on patients with symptoms of reactive hypoglycemia. *Metabolism* **36**: 351-355.
- Vincent, J. B. (1999) Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**: 6-12.
- Chen, G., Liu, P., Pattar, G. R., Tackett, L., Bhonagiri, P., Strawbridge, A. B. and Elmendorf, J. S. (2006) Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* **20**: 857-870.
- von der Crone, S., Deppe, C., Barthel, A., Sasson, S., Joost, H. G. and Schrmann, A. (2000) Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**: 943-949.
- Palanivel, R., Maida, A., Liu, Y. and Sweeney, G. (2006) Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* **49**: 183-190.
- Adachi, J., Kumar, C., Zhang, Y. and Mann, M. (2007) In-depth analysis of the adipocyte proteome by mass spectrometry and bioinformatics. *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 1257-1273.
- Hyun, C. K., Kim, I. Y. and Frost, S. C. (2004) Soluble fibroin enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* **134**: 3257-3263.
- Agarwal, O. P. (1985) Prevention of atheromatous heart disease. *Angiology* **36**: 485-492.
- Ghannam, N., Kingston, M., Al-Meshaal, I. A., Tariq, M. and Parman, N. S., (1986) Woodhouse, N. The antidiabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observations. *Horm. Res.* **24**: 288-294.
- Ajabnoor, M. A. (1990) Effect of aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* **28**: 215-220.
- Bunyapraphatsara, N., Yongchaiyudha, S. and Rungpitarangsi, V. (1996) Chokechajaroenporn, O. Antidiabetic activity of *Aloe vera* L. juice. II. Clinical trial in diabetes mellitus patients in combination with glibenclamide. *Phytomedicine* **3**: 245-248.
- Yongchaiyudha, S., Rungpitarangsi, V., Bunyapraphatsara, N. and Chokechajaroenporn, O. (1996) Antidiabetic activity of *Aloe vera* L. juice. I. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine* **3**: 241-243.

27. Beppu, H., Nagamura, Y. and Fujita, K. (1993) Hypoglycaemic and antidiabetic effects in mice of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger. *Phytother. Res.* **7**: S37-S42.
28. Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Ravi, K. and Subramanian, S. (2004) Hypoglycemic effect of *Aloe vera* gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *J. Med. Food* **7**: 61-66.
29. Rajasekaran, S., Sivagnanam, K. and Subramanian, S. (2005) Modulatory effects of *Aloe vera* leaf gel extract on oxidative stress in rats treated with streptozotocin. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**: 241-246.
30. Rajasekaran, S., Ravi, K., Sivagnanam, K. and Subramanian, S. (2006) Beneficial effects of *Aloe vera* leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **33**: 232-237.
31. Beppu, H., Shimpō, K., Chihara, T., Kaneko, T., Tamai, I., Yamaji, S., Ozaki, S., Kuzuya, H. and Sonoda, S. (2006) Antidiabetic effects of dietary administration of *Aloe arborescens* Miller components on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice: investigation on hypoglycemic action and systemic absorption dynamics of aloe components. *J. Ethnopharmacol.* **103**: 468-477.
32. Park, M. Y., Kwon, H. J. and Sung, M. K. (2011) Dietary aloin, aloesin, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model. *Life Sci.* **88**: 486-492.
33. Lee, K. Y., Park, J. H., Chung, M. H., Park, Y. I., Kim, K. W., Lee, Y. J. and Lee, S. K. (1997) Aloesin up-regulates cyclin E/CDK2 kinase activity via inducing the protein levels of cyclin E, CDK2, and CDC25A in SK-HEP-1 cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**: 285-292.
34. Schwarz, K. and Mertz, W. (1957) A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. *Arch. Biochem. Biophys.* **72**: 515-518.
35. Hopkins, L. L. Jr, Ransome-Kuti, O. and Majaj, A. S. (1968) Improvement of impaired carbohydrate metabolism by chromium 3 in manourished infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **21**: 203-211.
36. Anderson, R. A. (1987) Chromium. In: trace elements in human and animal nutrition (W. Mertz, ed), 5th ed., 225-244, Academic Press, In., New York.
37. Offenbacher, E. G. and Pi-Sunyer, F. X. (1980) Beneficial effect of chromium-rich yeast on glucose tolerance and blood lipids in elderly subjects. *Diabetes* **29**: 919-925.
38. Mertz, W. (1969) Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* **49**: 163-239.
39. Michelle, Furtado, L., Poon, V. and Klip, A. (2003) GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol. Scand.* **178**: 287-296.
40. Steckli, J., Fazakerley, D. J. and James, D. E. (2011) GLUT4 exocytosis. *J. Cell Sci.* **124**: 4147-4159.
- (2013. 3. 5 접수; 2013. 3. 8 심사; 2013. 3. 12 게재확정)