

Streptozotocin에 의해 유도된 당뇨모델동물에서 황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Leveille)의 열수추출물과 에탄올추출물의 당뇨 질환 개선 효능*

안나영^{1**} · 김지은^{2**} · 황대연² · 류호경^{1†}
부산대학교 식품영양학과,¹ 부산대학교 생명자원과학대학²

Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Leveille in streptozotocin-induced diabetes model*

An, Na Young^{1**} · Kim, Ji-Eun^{2**} · Hwang, DaeYoun² · Ryu, Ho Kyung^{1†}

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

²Department of Biomaterials Science, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Dendropanax morifera* Leveille (DML) exhibits diverse biological and pharmacological activities, including anti-oxidative effect, anti-cancer activity, hepatoprotection, immunological stimulation, and bone regeneration. As part of the identification for novel functions of DML, we investigated the therapeutic effects of DML on diabetes induced by streptozotocine (STZ) treatment. **Methods:** First, the four extracts including the water extract of leaf (DLW), the ethanol extract of leaf (DLE), the water extract of stem (DSW), and the ethanol extract of stem (DSE) were collected from the leaf and stem of DML using a hot water and ethanol solvent. Alterations in body weight, glucose concentration, insulin level, and pancreatic islet structure were investigated in diabetic mice after treatment with extracts of DML for 2 weeks. **Results:** Among four extracts, the highest level of total polyphenols and total flavonoids was detected in DLW, while the lowest level of these was measured in DSE. The radical scavenging activity was also higher in DLW than in the other three extracts at the concentration of 25–100 µg/mL, although this activity was maintained at a constant level in all groups at the concentration of 500 µg/mL. Based on the results of anti-oxidant activity, DLW and DLE were selected for examination of anti-diabetic effects in a diabetes model. Body weight was gradually decreased in all STZ treated groups compared with the No treated group. However, four STZ/DML treated groups maintained a high level of body weight during 7–14 days, while the STZ/vehicle treated group showed a gradual decrease of body weight during the same period. Also, a significant decrease or increase in the concentration of glucose and insulin in the blood of the diabetes model was detected in a subset of groups, although the highest increase was detected in the STZ/DLE–200 treated group. In addition, the histological structure of pancreatic islet was significantly recovered after treatment with DLW and DLE. **Conclusion:** These results suggest that DLW and DLE may contribute to attenuation of clinical symptoms of diabetes as well as prevent the destruction of pancreatic β-cells in STZ-induced diabetes mice.

KEY WORDS: *Dendropanax morifera* Leveille, diabetes, glucose, insulin, pancreatic islets

서 론

황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Leveille)는 황칠나무속 (*Dendropanax*)에 속하는 아열대성 상록활엽수로 분류되며, 중남미와 말레이반도를 포함하여 동남아시아 등 열대, 아열대, 난대지방에 약 30여종이 분포하고 있다.¹ 그

중 우리나라의 황칠나무는 1속 1종의 고유수종으로 서남해안 지역의 전남 해남, 완도, 보길도, 제주도의 한라산 일대 그리고 일부 도서 지역에 자생하고 있는 것으로 알려져 있다.²

황칠은 황칠나무의 수피에 상처를 주어 배출되는 황색의 수지액으로, 안식향을 가짐으로써 진정효과가 있는 고급

Received: December 2, 2013 / Revised: December 23, 2013 / Accepted: November 26, 2014

*This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

**These two authors contributed to this work equally.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-51-510-7397, e-mail: hokryu@pusan.ac.kr

© 2014 The Korean Nutrition Society

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.

도로로 삼국사기의 문헌에서는 황제의 갑옷 및 투구, 그리고 장신구 등을 칠하는데 주로 이용되었다.³ 황칠나무의 뿌리와 줄기는 맛이 달고 성질은 따뜻하여 거풍습과 황혈맥 등에 효능이 있으며⁴ 황칠나무 잎과 줄기 추출물은 각각 85%와 75% 이상의 활성산소 제거능력을 가지고 있다.⁵ 또한 이들 물질은 클로로퀸에 민감한 균주에 대하여서는 성장억제능을 나타내었고,⁶ 면역세포의 생육을 촉진시켜 각종 질병을 야기하는 원인들에 대한 조기 면역체계 및 생체 방어체계를 강화하는 효과를 나타내었다.⁷ 황칠나무의 열수추출물은 HepG2/2E1 세포주에서 알코올에 의한 산화적 손상을 억제하였으며, 실험동물에서 항산화효소의 활성을 증가시켜 자유라디칼 (free radical)을 효과적으로 제거하였다.⁸ 더불어, 황칠나무에서 추출한 Oleifoliosides A와 B, cycloartane-타입의 배당체는 다양한 염증매개물질들의 분비를 억제하였고, 암세포에서 세포사멸 유도인자인 AIF와 EndoG 단백질을 발현 증가 및 핵으로의 이동을 촉진시켜 세포사멸을 유도하였다.⁹ 한편, 황칠나무의 정유 성분은 랫드에서 total cholesterol, LDL cholesterol, TG의 감소와 HDL cholesterol의 증가를 통해 지질개선 효과를 유도하였다.¹⁰ 또한 황칠나무의 추출물은 치주 인대세포와 조골세포의 증식 촉진, ALP와 석회화 결절수의 활성 증가, 뼈와 치아의 재생 촉진 등을 통해 충치, 치주질환, 골다공증, 관절염의 예방 및 어린이 성장에 효과적으로 작용하였다.¹¹ 이처럼 다양한 황칠나무의 약효에 대한 연구논문이 있지만, 당뇨병의 치료효능 및 작용기전 연구는 매우 제한적으로 수행되었고 실제 식품으로서 활용가능성에 대한 연구는 미비한 실정이다.^{4,8}

당뇨병 (Diabetes mellitus)은 췌장으로부터 인슐린 분비량이 부족하거나 체내 세포들이 인슐린에 대한 적절한 반응을 나타내지 못해 발생하며, 오랜 기간 동안 높은 혈중 포도당의 농도를 나타내는 대사성질환이다.¹² 특히, 산화적 스트레스 (Oxidative stress)는 당뇨병의 진행과 합병증에서 매우 중요한 역할을 하며,¹³ 과량의 혈중 포도당과 자유지방산 (Free fatty acid)는 무산소상태 해당과정 (Anaerobic glycolysis)과 미토콘드리아비결합 자동산화와 베타산화 (Autoxidation mitochondrial uncoupling and β -oxidation)에 의해 과량의 활성산소를 생산을 유도한다. 그리고 증가된 산화적 스트레스는 항산화 방어체계와 체내 여러 조직들을 손상시킨다.¹⁴ 그러나 췌도는 항산화효소의 발현이 매우 적어 과량의 산화적 스트레스물질들에 의해 베타세포의 DNA와 막에 손상이 쉽게 발생하며, 이로 인해 췌도의 상해나 베타세포의 기능손상이 유도된다.^{15,16} 따라서, 최근에 많은 연구에서는 황연 (*Rhizomacoptidis*),¹² 살라시아 (*Salaciachinensis L.*),¹⁷ 췌기풀 (*Urticapilulifera*),¹⁸ 호자

나무 (*Morindaofficinalis*)¹⁹ 등 항산화기능을 갖는 다양한 추출물들을 이용한 당뇨병환의 개선에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 황칠나무의 부위와 추출 용매에 따른 항산화능을 비교한 후 항산화능이 우수한 황칠나무 잎을 이용하여 당뇨병환에 대한 효능을 측정하고자 하였다. 선행 연구에 의하면 황칠나무 낮은 줄기부분의 메탄올 추출물인 Dendropanoxide와 잎의 에탄올 추출물은 혈당 조절에 효과가 있음을 나타내었다.²⁰ 하지만 실질적으로 일상생활에서 쉽게 복용하는 방법은 물에 끓여 차로 먹는 방법이지만 열수추출물에 대한 당뇨병환 개선효능이 연구되지 않아 열수추출물을 경구 투여하여 혈당의 변화와, 뇨의 분석, 인슐린 분비, 췌장 조직의 변화 등 당뇨 인자를 평가하여 당뇨병환 개선효과를 측정하고자 하였다.

연구방법

실험재료

본 실험에 사용한 황칠나무는 2012년 10월경 전라남도 완도군 신지면 일대에서 수확하여 자연 건조한 잎과 줄기를 구입하여 사용하였다. 열수추출물의 제조는 잎과 줄기 각 100 g을 시료의 무게 대비 10배 부피의 용매 비율의 증류수를 첨가하여 추출기 (전기약탕기, DW-290, 대웅바이오가전(주))에서 2시간 30분 추출하였다. 추출물은 filter (Whatman NO. 1, UK)한 후 evaporator (BUCHI, Switzerland)를 사용하여 감압농축하였다. 농축된 시료는 동결건조기 (SAMWON, Korea)를 사용하여 120시간 동안 동결건조시켜 제조하였으며, 에탄올추출물의 제조 또한 동일한 방법으로 잎과 줄기 각 100 g을 시료의 무게 대비 10배 부피의 용매 비율의 70% ethanol을 가하여 잎의 열수추출물 (DLW), 잎의 에탄올 추출물 (DLE), 줄기의 열수추출물 (DSW), 줄기의 에탄올추출물 (DSE)으로 시료를 제조하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

DPPH 소거능은 Hatano²¹의 방법을 변형하여 사용하였으며, 70% Ethanol에 녹인 각 농도별분획물 (25, 50, 100, 500 μ g/mL) 20 μ L와 0.4 mM DPPH용액 80 μ L를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 유리라디칼 (Free radical) 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 자유라디칼소거능을 백분율 (%)로 나타내었다.²¹ 이 때, 활성비교를 위하여 BHA (butylated hydroxyanisole)를 양성대조군으로 사용하였다.

Total polyphenol 및 total flavonoid 함량 측정

시료에 함유하는 total polyphenols 함량은 Folin-Denis 법²²을 응용하여 측정하였다. 먼저 시료 추출물 1 mg을 70% 에탄올 1 mL에 용해시키고 2배 희석한 Folin-Ciocalteu (Sigma Co., USA) 1 mL를 첨가하여 27°C 수욕조에서 혼합한다. 5분 정도 경과 후 10% Na₂CO₃포화용액 1 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 동안 방치하고 UV/VIS spectrophotometer (Cary 500, Varian, USA)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, gallic acid를 이용한 표준곡선은 최종농도가 0, 12.25, 25, 50, 100 µg/mL이 되도록 작성하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

Total flavonoids 함량은 Isla 등²³이 개발한 분광분석법을 이용하여 측정하였다. 먼저, 각 샘플 (0.1 mL)와 70% 에탄올 (0.9 mL)을 혼합한 혼합물에 10% aluminium nitrate (0.5 mL)와 1 M potassium acetate (0.1 mL) 그리고 70% 에탄올 (4.3 mL)을 가하여 실온에 40분 경과한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때, total flavonoids 함량은 quercetin을 이용한 표준곡선은 최종농도가 0, 12.25, 25, 50, 100 µg/mL이 되도록 작성하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

동물실험 설계

실험동물은 체중 32~36 g의 ICR 마우스(7주령, 수컷)를 (주)샘타코BIOKOREA (Osan, Korea)에서 구입하여 방사선 조사된 사료 (Purina Mills Inc., St. Louis, Missouri, USA)를 자유급식하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 specific pathogen free (SPF) 상태인 부산대학교 청정실험동물센터 (온도 22 ± 1°C, 상대습도 50 ± 5%)에서 사육하였다. 또한, 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회 (PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인 (승인번호: PNU-2012-0170)을 받아 수행되었다. 총 36마리의 ICR 마우스는 그룹당 6마리씩 총 6개 군으로 분류하였다: 1) 당뇨를 유발하지 않은 정상군 (No 처리군), 2) 당뇨유발 후 Vehicle 처리군 (STZ/Vehicle 처리군), 3) 당뇨유발 후 황칠나무잎 열수추출물 100 mg/kg 처리군 (STZ/DLW-100 처리군), 4) 당뇨유발 후 황칠나무잎 열수추출물 200 mg/kg 처리군 (STZ/DLW-200 처리군), 5) 당뇨유발 후 황칠나무잎 에탄올추출물 100 mg/kg 처리군 (STZ/DLE-100 처리군), 6) 당뇨유발 후 황칠나무잎 에탄올추출물 200 mg/kg 처리군 (STZ/DLE-200 처리군).

당뇨유발을 위해, 0.01 M citrate buffer (pH 4.5)의 STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA)을 70 mg/kg body weight로 5일간 복강 투여하였다. Fasting blood glucose

level을 측정하여 혈당이 200 mg/dL 이상이 되었을 때, 1일 1회 2주간 Vehicle, 황칠나무 잎의 열수추출물과 에탄올추출물을 100 혹은 200 mg/kg의 농도로 경구 투여하였다.

체중 및 혈당 측정

실험동물의 체중은 경구투여 전과 부검 전에 화학저울 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 혈당은 8-12시간 절식시킨 후 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기 (CareSens II, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

노 분석

각 실험군의 마우스로부터 뇨를 채취하여, 육안비색용 뇨검사 시험지인 Uriscan urine test strips (YeongDong, Korea) 시험지를 사용하여 성분을 측정하고, 시험지의 기준표를 참고하여 판정하였다.

인슐린 분비량 측정

실험동물의 인슐린 분비량은 Mouse Insulin ELISA Kit (Mercodia AB, Sweden)를 이용하여 회사의 권장법에 따라 측정하였다. 먼저, 마우스의 복대정맥으로부터 채취한 혈액을 상온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 혈청을 분리한다. 분리된 혈청은 ELISA kit의 각 well에 25 µL씩 넣고, 100 µL의 enzyme conjugate solution을 첨가하여 plate shaker에 1시간 동안 방치하여 항원-항체반응을 유도하였다. 1시간 후 상층액을 제거하고, wash buffer (350 µL)를 이용하여 비특이적으로 결합된 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 세척하였다. 여기에 200 µL의 substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤 50 µL의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타나는 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

췌장조직의 분석

마우스로부터 적출한 췌장조직은 부검 직후 10% 포르말린용액에 48시간 고정된 후, 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣은 후 조직처리기 (Shandon CitaDLEI 1000, Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK)를 이용하여 고정시켰다. 고정된 조직은 Paraffin Embedding Station (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany)을 사용하여 함침시킨 후 Rotary Microtome (Leica Microsystems Nussloch GmbH)을 사용하여 박절하였다. 조직 내 변화를 알아보기 위하여 Hematoxylin과 Eosin (H&E) 염색을 실

시하였고, 이는 4 µm의 크기로 박절된 조직을 xylene에 3분씩 3번, 100% alcohol에 각각 2분, 1분 담근 후 95, 80, 70% alcohol에 각각 1분 30초씩 담근 후에 물로 1분 세척한 뒤 hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA)에 3분, 1% acid-alcohol에 30초, 10% scott' tap water (Sigma-Aldrich)에 1분, Eosin (Sigma-Aldrich)에 3분 동안 처리하여 조직 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 70-80-95-100% alcohol의 순서로 탈수과정을 거치고 마지막으로 xylene에 3분씩 3번 처리하였다. 마지막으로 kanadabalsam과 xylene을 섞은 고정제를 이용하여 조직을 슬라이드에 고정시킨 후 건조하였다. 췌장조직의 변화에 미치는 DLW와 DLE의 영향은 BX50F-3 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, Leica Application Suite (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여 분석하였다.

박절된 췌장조직에서 인슐린의 분비를 측정하기 위하여, 인슐린 항체를 이용하여 면역염색 (immunostaining)을 실시하였다.¹⁶ 박절된 조직은 xylene과 ethanol 처리로 파라핀을 제거한 후 3% H₂O₂에 10분간 고정하였다. 췌장조직은 증류수를 이용하여 세척 후 10% BSA에 담귀 10분간 blocking한 뒤에 인슐린항체 (#4590, Cell Signaling Technology)와 1% BSA를 1:100 농도로 희석한 뒤에 슬라이드에 100 µL씩 떨어뜨려 밤새 배양하였다. 1X PBS로 세척한 후에 Polink-2 Plus HRP Detection Kit for Rabbit Antibody (Golden Bridge International, USA)를 이용하여 염색하고 permounting를 실시한 후 BX50F-3 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, Leica Application Suite (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여 분석하였다.

통계처리

모든 실험결과는 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다. P-value < 0.05를 유의성이 있는 값으로 인정하였으며, 실험결과는 means ± SD로 제시하였다.

결 과

황칠나무의 잎과 줄기 추출물에서 항산화성분의 분석

황칠나무의 잎과 줄기추출물에서 항산화성분의 농도를 분석하기 위하여, total polyphenol과 total flavonoid의 농도를 4가지 추출물에서 분석하였다. 그 결과, DLW는 가장 높은 total polyphenol (19,080 µg/g)과 total flavonoid (1,018 µg/g)의 농도를 나타내었고, DLE는 두 번째로 많은 total polyphenol (12,561 µg/g)과 total flavonoid (803 µg/g)

Table 1. Contents of total polyphenols and flavonoids in hot water extracts and ethanol extracts from *Dendropanax morifera* Lev-eille

	Total polyphenols ¹⁾ (µg/g)	Total flavonoids ²⁾ (µg/g)
DLW	19,080.51 ± 3.56 ^{d 3)}	1,018.90 ± 0.07 ^a
DLE	12,561.03 ± 3.21 ^c	803.79 ± 0.17 ^b
DSW	12,207.18 ± 2.35 ^b	228.83 ± 0.07 ^c
DSE	10,266.66 ± 0.89 ^a	220.68 ± 0.11 ^d

1) Milligrams of total polyphenol content/g of plants based on gallic acid as standard. 2) Milligrams of total flavonoid content/g of plants based on quercetin as standard. 3) Each value is mean ± S.D. (n ≥ 3).

a-d Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

DLW, water extract of leaf; DLE, the ethanol extract of leaf; DSW, water extract of stem; DSE, ethanol extract of stem.

g)를 함유하고 있었다. 그러나, DSW와 DSE는 상대적으로 적은 양의 total polyphenol과 total flavonoid를 함유하고 있었다 (Table 1). 이러한 결과는 황칠나무의 잎의 열수추출물과 에탄올추출물이 많은 항산화물질을 포함하고 있음을 제시하고 있다.

황칠나무의 잎과 줄기 추출물의 DPPH 소거능

황칠나무의 잎과 줄기의 열수추출물과 에탄올추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해, 4가지 다른 농도에서 DPPH 소거능을 분석하였다. 그 결과, 비록 DPPH 소거능은 양성 대조군인 BHA보다는 낮지만, 황칠나무의 모든 추출물은 25-100 µg/mL의 농도구간에서 농도의존적으로 DPPH 소거능이 증가하였다. 특히, 이 농도구간에서 DLW는 DLE, DSW, DSE보다 우수한 DPPH 소거능을 나타내었다. 그러나, 500 µg/mL 농도에서는 4가지 추출물간에 유의적인 DPPH 소거능에 차이를 나타내지 못하였다 (Table 2). 따라서, 이러한 결과는 황칠나무 잎의 열수추출물과 에탄올추출물이 우수한 항산화능을 가지고 있음을 제시하고 있다. 이러한 결과를 바탕으로, 당뇨모델동물에서 당뇨질환 개선효능을 평가하기 위한 물질로 DLW와 DLE를 선정하여 동물실험을 실시하였다.

DLW와 DLE가 당뇨모델동물의 체중과 혈당에 미치는 영향

DLW와 DLE가 당뇨모델동물의 체중과 혈당에 미치는 영향을 분석하기 위해, 2주 동안 2가지 농도의 DLW와 DLE를 투여한 후 각 집단에서 실험동물의 체중과 혈당의 변화를 측정하였다. 그 결과, 당뇨를 유발하기 전 마우스의 평균 체중은 38.38 g으로 군간 유의적인 차이가 없었으나, 시간의 경과에 따라 No 처리군을 제외한 나머지 군에서는

Table 2. DPPH radical scavenging activity of *Dendropanax morifera* Leveille hot water extracts and ethanol extracts

Sample	Radical scavenging activity				
	DLW	DLE	DSW	DSE	BHA
25 µg/mL	18.28 ± 3.11 ^c	15.27 ± 1.99 ^c	5.74 ± 2.77 ^a	10.84 ± 2.72 ^b	29.67 ± 1.65 ^d
50 µg/mL	28.81 ± 3.72 ^c	22.78 ± 2.55 ^b	12.44 ± 1.04 ^a	11.76 ± 0.64 ^a	50.26 ± 4.04 ^d
100 µg/mL	59.68 ± 2.20 ^c	47.52 ± 0.91 ^b	24.58 ± 0.87 ^a	22.11 ± 1.49 ^a	76.55 ± 2.94 ^d
500 µg/mL	75.72 ± 5.95	78.87 ± 6.78	77.04 ± 6.91	75.11 ± 6.61	82.71 ± 7.54
IC ₅₀ (µg/mL)	212.70	243.33	308.30	317.07	46.46

All values are mean ± S.D.

a~d Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

DLW, water extract of leaf; DLE, the ethanol extract of leaf; DSW, water extract of stem; DSE, ethanol extract of stem; BHA, butylatedhydroxyanisole.

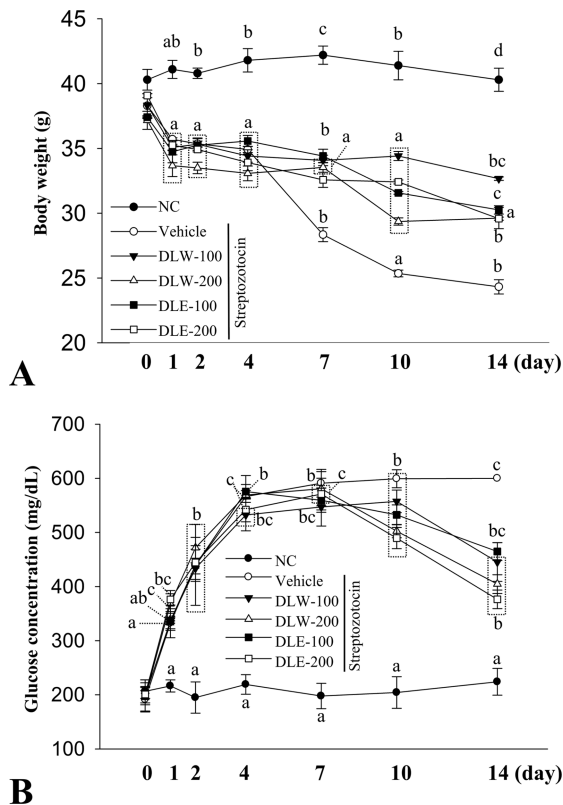


Fig. 1. Change in body weight and glucose concentration following DLW and DLE treatment. (A) Body weight of the mice in the 6 groups was measured using a chemical balance after the final DLW and DLE treatment. (B) The mice were treated orally with DLW and DLE (100, 200 mg/kg body weight/day) for 2 weeks. The glucose concentration was measured in the blood collected from the tail vein of mice at seven different times using the sensitive strip of the Blood Glucose Monitoring System. The control group received the vehicle only. Data are reported as the mean ± SD from 3 replicates. a~d Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. A statistically significant difference for specific level in some groups was represented as a group within Dash-lined box. NC, normal control; STZ/DLW-100, streptozotocin/water extract of leaf-100 mg/kg; STZ/DLW-200, streptozotocin/water extract of leaf-200 mg/kg; STZ/DLE-100, streptozotocin/ethanol extract of leaf-100 mg/kg; STZ/DLE-200, streptozotocin/ethanol extract of leaf-200 mg/kg.

유의적으로 체중이 감소하였다. 그러나 7-14일 구간에서, STZ/DLW와 STZ/DLE 처리군의 체중은 일정하게 유지되거나 약간 감소하였으나 STZ/vehicle 처리군에서는 지속적으로 감소하였다 (Fig. 1A). 이러한 결과는 DLW와 DLE는 7-14일 사이에 체중의 감소를 억제하는 효과가 있음을 제시하고 있다.

또한, DLW와 DLE의 혈당농도 억제효능을 분석하기 위해, 2주 동안 혈당농도를 각 그룹에서 측정하였다. 그 결과, 혈당농도는 STZ 처리군에서 No 처리군에 비하여 크게 증가하였으나, 4개의 DLW와 DLE 처리군에서는 10-14일에 유의적으로 감소하였다. 특히, STZ/DLW-200 처리군과 STZ/DLE-200 처리군은 STZ/DLW-100 처리군과 STZ/DLE-100 처리군에서 비하여 유의적으로 낮은 혈당농도를 나타내었다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 DLW와 DLE는 고농도로 장기간 투여하는 경우에 STZ에 의해 증가된 혈당을 감소시키는 효과가 있음을 제시하고 있다.

DLW와 DLE가 인슐린의 분비에 미치는 영향

혈당량 감소에 미치는 DLW와 DLE의 효능이 체내 인슐린 분비에 의해 유도되는지 확인하기 위해, 혈청 내 인슐린 농도의 변화를 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 인슐린 농도는 STZ/Vehicle 처리군이 No 처리군에 비해 유의적으로 68.4% 감소하였으나, STZ/DLW 처리군과 STZ/DLE 처리군에서 회복되었다. 특히, 인슐린 농도는 STZ/DLE-200 처리군이 다른 처리군에 비해 가장 높은 증가를 나타내었다 (Fig. 2A).

또한, 이러한 혈청 내 인슐린 농도의 변화가 인슐린 분비 기관인 췌장조직의 베타세포에서도 나타나는지 확인하기 위해, 췌장조직을 H&E 염색과 면역염색을 실시하여 변화를 관찰하였다. 그 결과, 베타세포의 형태는 No 처리군에서는 세포 밀도가 높으면서 균일하게 분포되어 외부비부위와 구분이 뚜렷하게 나타났지만, STZ/Vehicle 처리군에서는 세포 밀도가 유의적으로 감소하였고 세포의 핵이 소

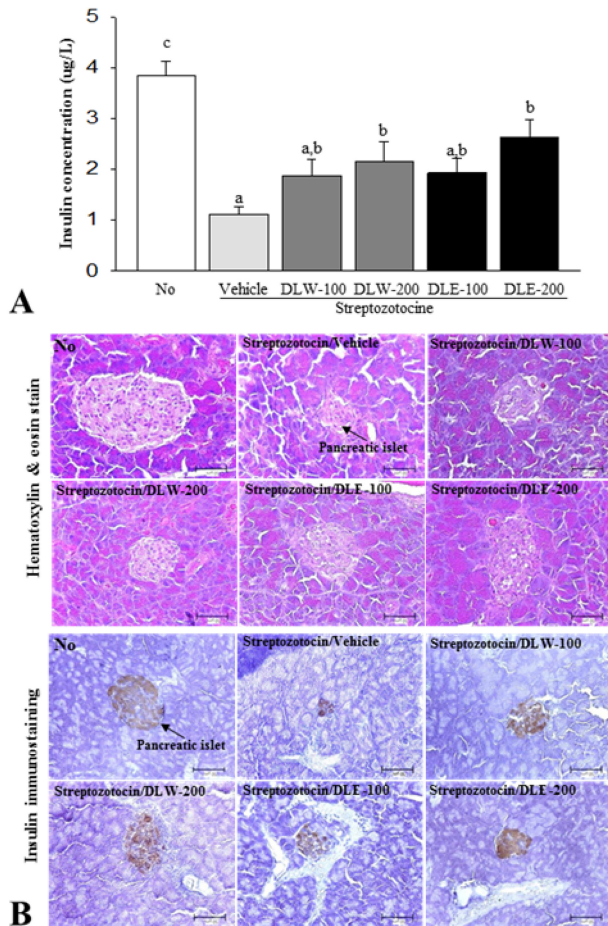


Fig. 2. Change in insulin concentration and the morphology of pancreatic islet following DLW and DLE treatment. (A) The insulin concentration was detected in the serum of streptozotocin-induced diabetic model animals on the final day. This kit has 0.1 ng/mL of sensitivity and inter-assay coefficient of variation was in the 2.86-5.17 range. Data are reported as the mean \pm SD from 3 replicates. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. (B) Histological analysis and immunostaining analysis for insulin expression. The expression level of insulin was detected in the pancreatic islets of STZ/vehicle treated mice by immunostaining analysis. A high intensity was observed in the pancreatic islets of the DLW or DLE treated mice compared with the STZ/vehicle treated mice at 200x magnification. NC, normal control; STZ/DLW-100, streptozotocin/water extract of leaf-100 mg/kg; STZ/DLW-200, streptozotocin/water extract of leaf-200 mg/kg; STZ/DLE-100, streptozotocin/ethanol extract of leaf-100 mg/kg; STZ/DLE-200, streptozotocin/ethanol extract of leaf-200 mg/kg.

실된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 STZ/DLW-200 처리군과 STZ/DLE-200 처리군에서는 세포 밀도가 유의적으로 증가하고 세포의 핵이 뚜렷하게 관찰되었다. 또한, 인슐린 항체를 이용한 면역염색 결과에서, 인슐린의 발현은 No 처리군에 비해 STZ/Vehicle 처리군에서 유의적으로 감소하였지만, STZ/DLW 처리군과 STZ/DLE 처리군에서 유

Table 3. Urinalysis of normal and STZ-induced diabetic mice fed with *Dendropanax morifera* Leveille

Group	Glucose	pH
NC	0	6.50 \pm 0.00
Vehicle	2,000.00 \pm 0.00 ^a	5.50 \pm 0.00 ^a
STZ/DLW-100	2,000.00 \pm 0.00 ^a	5.50 \pm 0.00 ^a
STZ/DLW-200	525.00 \pm 984.46 ^{a,b}	5.88 \pm 0.75 ^{a,b}
STZ/DLE-100	2,000.00 \pm 0.00 ^a	5.50 \pm 0.00 ^a
STZ/DLE-200	175.00 \pm 106.07 ^{a,b}	5.75 \pm 0.65 ^{a,b}

Values are mean \pm SD (n=6).

^{a-b} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

NC, normal control; STZ/DLW-100, streptozotocin/water extract of leaf-100 mg/kg; STZ/DLW-200, streptozotocin/water extract of leaf-200 mg/kg; STZ/DLE-100, streptozotocin/ethanol extract of leaf-100 mg/kg; STZ/DLE-200, streptozotocin/ethanol extract of leaf-200 mg/kg.

의적으로 증가하였다 (Fig. 2B). 이러한 결과, DLW와 DLE 처리는 STZ에 의해 유발된 당뇨병모델동물의 췌장베타세포로부터 인슐린분비를 촉진시킴으로써 혈당의 회복을 유도함을 제시하고 있다.

DLW와 DLE가 뇨분석 인자에 미치는 영향

DLW와 DLE가 뇨분석 인자에 미치는 영향을 분석하기 위해, 배설 후 3시간 이내의 신선한 뇨를 수거하여 포도당, 빌리루빈 (bilirubin), 케톤체 (ketone body), pH, 단백, 백혈구 (leukocyte) 등을 측정하였다. 그 결과, 뇨당을 제외한 다른 분석한 모든 인자의 농도에는 유의적인 차이가 없었다. 그러나, 뇨당의 농도는 No 처리군에서는 검출되지 않았으며, STZ/Vehicle 처리군에서 측정 가능한 최대치까지 증가하였다. 그러나, 이러한 농도는 STZ/DLW-200 처리군과 STZ/DLE-200 처리군에서 STZ/Vehicle 처리군에 비해 유의적으로 감소하였고, STZ/DLW-100 처리군과 STZ/DLE-100 처리군에서는 변화가 없었다. 또한, pH는 STZ/vehicle 처리군이 No 처리군에 비하여 유의적으로 감소하였으나 DLW와 DLE 처리군에서는 유의적인 변화가 없었다 (Table 3). 이러한 결과는 고농도의 DLW와 DLE 처리군은 뇨당 농도의 감소를 유도함을 제시하고 있다.

고 찰

최근 만성질환과 노화를 지연시키고자 생리활성물질을 이용한 예방 및 치료보조제에 관한 연구가 증가되고 있다.²⁴ 산화적 스트레스 (oxidative stress)는 세포의 대사과정 중 free radical과 기타 활성산소 (reactive oxygen), 과산화물의 생성으로 활성산소종의 생성이 증가되어 발생하며, 여러 가지 질병의 원인이 되고 있다.²⁵ 따라서 본 연구에서는

황칠나무의 부위에 따른 항산화능을 측정하고, 항산화능이 높게 나타난 잎을 이용하여 STZ유발 당뇨모델동물에서 열수추출물과 에탄올추출물을 농도별로 경구투여 한 후 당뇨질환 개선효능에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 실험에서 황칠나무 부위에 따른 잎과 줄기, 용매에 따른 열수추출물과 에탄올추출물의 DPPH 소거능을 비교한 결과 줄기보다는 잎이, 에탄올추출물보다는 열수추출물이 더 높은 항산화능을 나타내었다. 이는 Moon⁵의 선행연구에서 줄기보다 잎이 높은 항산화능을 나타낸 결과와 동일한 경향을 보였다. 또한, 항산화능을 나타내는 polyphenol 화합물은 세포벽 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합을 이루고 있거나 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화를 나타낸다. 또한, polyphenol 류는 자유기로부터 항산화 체계를 통하여 조직을 보호해주는 역할을 가지는 것으로 알려져 있고,²⁶ 단백질과 같은 거대 분자와 결합하여 항산화, 항균, 항암 등의 생리기능을 가지는 것으로 보고되고 있다.²⁶ 본 연구에서 total polyphenol 함량 측정에서는 황칠나무 잎의 열수추출물이 19,080 µg/g, 황칠나무 잎의 에탄올추출물 12,561 µg/g, 황칠나무 줄기의 열수추출물 12,207 µg/g, 황칠나무 줄기의 에탄올추출물 10,266 µg/g의 순으로 함유량이 높았으며, 각 군간의 유의적인 차이를 나타내었다. 이러한 농도는 화살나무 잎 (10.6 mg/g),²⁷ 오죽 잎 (19.5 mg/g)²⁸에 비하여 높게 나타났다. 한편, flavonoid는 식물계에 다량 존재하며 항산화 작용, 순환기 질환 예방, 항염, 항알러지, 항균, 항 바이러스, 면역증강, 모세혈관 강화 등 다양한 기능성 생리활성을 나타낸다.²⁹ Total flavonoid 함량은 total polyphenol 함량과 동일한 경향을 나타내었다. 이상의 결과로 total polyphenols 과 total flavonoids 또한 DPPH 소거능과 같이 줄기보다는 잎이, 에탄올추출물 보다는 열수추출물이 더 높은 항산화능을 가지는 것으로 사료되어진다.

한편, 황칠나무 잎의 열수추출물과 에탄올추출물을 경구 투여하여 체중 변화를 관찰한 결과, No 처리군은 체중을 2주간 일정수준의 체중을 유지하였으나, STZ/vehicle 처리군, STZ/DLW 처리군, STZ/DLE 처리군은 시간의 경과에 따라 모두 체중이 감소하였다. 그러나 실험후반부에 STZ/DLW 처리군과 STZ/DLE 처리군은 감소율이 적었으나 STZ/vehicle 처리군은 감소율이 매우 높았다. 이러한 결과는 선행연구에서 BMI가 유의적으로 감소한 결과와 유사한 경향을 나타내었다.³⁰

혈당은 DLW와 DLE 처리군에서 매우 유사하게 감소하는 효과를 나타냄을 제시하고 있다. 즉, 황칠나무 잎의 DLW 처리군에서도 혈당상승 억제효과가 높게 나타나는 것을 보아 일반적으로 손쉽게 섭취할 수 있는 황칠나무 잎을 차

로 복용하였을 때 혈당 상승의 억제 효과를 나타낼 것으로 사료되어진다. 하지만, 비록 DLW와 DLE가 우수한 ROS 제거능을 나타내었지만 실제 당뇨병은 과산화물에 의해 직접적으로 유발되기보다는 질병과 합병증을 촉진하는 역할을 하므로 실제 사람의 치료에 적용하기 위해서는 이러한 점이 반드시 고려되어야 할 것으로 사료된다.

노당 농도는 100 mg/kg 농도로 처리된 DLW와 DLE 처리군에서는 STZ/vehicle 처리군과 유의적인 차이가 없었으나 200 mg/kg 농도로 처리된 DLW와 DLE 처리군에서는 유의적으로 감소하였다. 이는 추출물의 경구투여 농도에 비례하여 효과가 나타나는 것으로 이전의 결과와 유사하게 나타내었다.

황칠나무의 인슐린 분비유도능은 다른 연구들⁴⁻¹⁰에서 제시된 것과 유사하게 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 DLW, DLE의 투여가 STZ이 췌장 내 Langerhans' Islet의 β-cell의 파괴를 완화하거나 파괴된 β-cell을 회복시키는 효과를 유도하는 것으로 사료된다. 또한, 췌장 Langerhans' Islet의 β-cell은 STZ치리에 의해 파괴되어 인슐린의 분비가 억제되며, 이러한 현상은 췌장조직의 H&E 염색과 면역염색을 통해 확인할 수 있다. 본 연구에서 조직학적 분석의 결과로부터 STZ/DLW-100 처리군, STZ/DLW-200 처리군, STZ/DLE-200 처리군이 STZ/vehicle 처리군에 비하여 뛰어난 효과를 가지므로 DLW의 급여가 STZ에 의한 췌장 Langerhans' Islet의 β-cell의 파괴를 감소시키고, β-cell의 생성을 도와 I형 당뇨에 효과를 보이는 것으로 사료된다.³¹ 따라서 STZ 유발 당뇨모델동물에서 황칠나무 잎의 농도 100 mg/kg과 200 mg/kg의 열수추출물과 200 mg/kg의 에탄올추출물 공급은 혈당 상승의 억제, 노당 농도의 감소, 혈중 인슐린 농도의 증가, 췌장의 Langrhans' Islet의 B-cell 파괴 완화 혹은 회복시키는 작용이 뚜렷하게 관찰되었다.

따라서, 이상의 연구결과는 황칠나무의 줄기보다 잎이 DPPH 소거능, total polyphenols과 total flavonoids의 함량이 우수함을 제시하고 있으며, 황칠나무 잎의 열수추출물과 에탄올추출물이 우수한 당뇨질환 개선효능을 나타냄을 제시하고 있다. 또한, 본 연구 결과를 통해 황칠나무는 다양한 건강 기능성식품 및 의약품의 소재로 개발될 가능성이 높으며, 다양한 산업적 활용이 높을 것으로 사료되어진다.

요 약

본 연구는 황칠나무의 부위별 추출물의 항당뇨효능을 평가하기 위해, 황칠나무의 잎과 줄기의 열수추출물과 에탄올추출물을 분리하여 항산화능과 당뇨질환 개선효능을 측

정하였다. 그 결과, total polyphenol과 total flavonoid의 농도는 DLW에서 가장 높게 나타났으며, 다음으로 DLE, DSW, DSE 순서로 나타났다. 또한, DPPH 소거능은 DLW가 대부분의 농도에서 가장 높게 나타났으며, DLE는 500 µg/mL의 농도에서 가장 높은 DPPH 소거능을 나타내었다. 항산화능이 우수한 DLW와 DLE를 선정하여 STZ로 유도된 당뇨병모델동물에 2주간 투여하여 항당뇨 효능을 분석하였다. 그 결과, 체중은 STZ/vehicle 처리군이 급격히 감소하였으나 STZ/DLW와 STZ/DLE 처리군에서 서서히 감소하였다. 혈당량은 STZ/vehicle 처리군에서 급격히 증가하였으며, STZ/DLW 처리군과 STZ/DLE 처리군에서만 유의적인 감소를 나타내었다. 그러나, 혈청 내 인슐린의 농도는 STZ/vehicle 처리군에 비하여 STZ/DLW와 STZ/DLE 처리군에서 증가하였으며, 특히 STZ/DEL-200 처리군에서 가장 높은 농도를 나타내었다. 이러한 변화는 체장의 조직학적 변화와 면역염색의 결과에서도 동일하게 관찰되었다. 더불어, 뇨당 농도는 STZ/vehicle 처리군에서 급격히 증가하였으며, 오직 STZ/DLW-200 처리군과 STZ/DLE-200 처리군에서만 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 황칠나무의 잎의 열수추출물과 에탄올추출물은 우수한 항산화효능과 베타세포의 사멸을 억제함으로써 당뇨질환을 개선하는 효능이 있음을 제시하고 있으며, 특히, 200 mg/kg의 농도가 우수한 효능을 나타내는 농도임을 제시하고 있다.

References

- Bernart MW, Cardellina JH 2nd, Balaschak MS, Alexander MR, Shoemaker RH, Boyd MR. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *J Nat Prod* 1996; 59(8): 748-753.
- Jeong BS, Jo JS, Pyo BS, Hwang B. Studies on the distribution of *Dendropanax morbifera* and component analysis of the golden lacquer. *Korean J Biotechnol Bioeng* 1995; 10(4): 393-400.
- Kong YT, Kang IA. Properties of paint film of "Hwangchil" - an ancient Korean natural golden varnish. *J Korea For Energy* 1993; 13(1): 1-6.
- Bae KH, Kim JA, Choi YE. Induction and in vitro proliferation of adventitious roots in *Dendropanax morbifera*. *J Plant Biotechnol* 2009; 36(2): 163-169.
- Moon CG. Antioxidant activity of *Dendropanax morbifera* Lev [dissertation]. Gimhae: Inje University; 2007.
- Chung IM, Kim MY, Park SD, Park WH, Moon HI. In vitro evaluation of the antiplasmodial activity of *Dendropanax morbifera* against chloroquine-sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Phytother Res* 2009; 23(11): 1634-1637.
- Park BY, Min BS, Oh SR, Kim JH, Kim TJ, Kim DH, Bae KH, Lee HK. Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax morbifera*. *J Ethnopharmacol* 2004; 90(2-3): 403-408.
- Yang JW. Protective effect of hot water extract of *Dendropanax morbifera* Lev on ethanol-induced liver damage [dissertation]. Seongnam: CHA University; 2010.
- Yu HY. Anti-cancer and anti-inflammatory activities of natural compounds isolated from hyul-tong-ryung and *Dendropanax morbifera* [dissertation]. Busan: Dong-A University; 2012.
- Chung IM, Kim MY, Park WH, Moon HI. Antiatherogenic activity of *Dendropanax morbifera* essential oil in rats. *Pharmazie* 2009; 64(8): 547-549.
- Beak WB. Biological activity studies of Korea specialties *Dendropanax morbifera* [dissertation]. Seoul: Kyunghee University; 2003.
- Li JC, Shen XF, Meng XL. A traditional Chinese medicine JiuHuangLian (*Rhizoma coptidis* steamed with rice wine) reduces oxidative stress injury in type 2 diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 59: 222-229.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615-1625.
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(5): E685-E694.
- McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(1): 7-18.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552(Pt 2): 335-344.
- Sellamuthu PS, Arulselvan P, Fakurazi S, Kandasamy M. Beneficial effects of mangiferin isolated from *Salacia chinensis* on biochemical and hematological parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pak J Pharm Sci* 2014; 27(1): 161-167.
- Abo-elmatty DM, Essawy SS, Badr JM, Sterner O. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Urtica pilulifera* extracts in type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2013; 145(1): 269-277.
- Soon YY, Tan BK. Evaluation of the hypoglycemic and anti-oxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J* 2002; 43(2): 077-085.
- Moon HI. Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30(8): 870-875.
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. : effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 1989; 37(8): 2016-2021.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 1912; 12: 239-243.
- Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 2001; 76(2): 165-170.
- Zhang XH, Choi SK, Seo JS. Effect of dietary grape pomace on lipid oxidation and related enzyme activities in rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 2009; 42(5): 415-422.
- Park SN. Skin aging and antioxidant. *J Soc Cosmet Sci Korea* 1997; 23(1): 75-132.
- Jung MJ, Heo SI, Wang MH. Comparative studies for component analysis in acorn powders from Korea and China. *Korean J Phar-*

- macogn 2007; 38(1): 90-94.
27. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol* 2007; 39(5): 569-574.
 28. Kim SM, Jeon JS, Kang SW, Kim WR, Lee KD, Um BH. Composition analysis and antioxidant activity of Ojuk (*Phyllostachys nigra* Munro) leaf tea and shoot tea. *J Appl Biol Chem* 2012; 55(2): 95-101.
 29. Lee SH, Lee YM, Lee HS, Kim DK. Anti-oxidative and anti-hyperglycemia effects of *Triticum aestivum* wheat sprout water extracts on the streptozotocin-induced diabetic mice. *Korean J Pharmacogn* 2009; 40(4): 408-414.
 30. Yoon JA, Kim JJ, Song BC. Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes on blood glucose and pancreatic islets histology in streptozotocin-induced diabetic rats. *J East Asian Soc Diet Life* 2012; 22(3): 334-340.
 31. Watanabe H, Sumi S, Urushihata T, Kitamura Y, Iwasaki S, Xu G, Yano S, Nio Y, Tamura K. Immunohistochemical studies on vascular endothelial growth factor and platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD-31 in islet transplantation. *Pancreas* 2000; 21(2): 165-173.