

Scopoletin 보충이 만성 알코올을 급여한 흰쥐의 인슐린저항성 및 항산화방어계에 미치는 영향

이해인 · 이미경
순천대학교 식품영양학과

Effects of Scopoletin Supplementation on Insulin Resistance and Antioxidant Defense System in Chronic Alcohol-Fed Rats

Hae-In Lee and Mi-Kyung Lee

Department of Food and Nutrition, Suncheon National University

ABSTRACT This study investigated the effects of scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin) supplementation on insulin resistance and the antioxidant defense system in chronic alcohol-fed rats. Rats were fed a Lieber-DeCarli liquid diet containing 5% ethanol with or without two doses of scopoletin (0.01 and 0.05 g/L) for 8 weeks. Pair-fed rats received an isocaloric carbohydrate liquid diet. Chronic alcohol did not affect fasting serum glucose levels, although it induced glucose intolerance and hyperinsulinemia compared with the pair-fed group and led to insulin resistance. Both doses of scopoletin similarly improved glucose intolerance, serum insulin level, and insulin resistance. Scopoletin supplementation significantly activated phosphatidyl inositol 3-kinase, which was inhibited by chronic alcohol. Two doses of scopoletin up-regulated hepatic mRNA expression and activity of glucokinase as well as down-regulated mRNA expression and activity of glucose-6-phosphatase compared with the alcohol control group. Both doses of scopoletin significantly reduced cytochrome P450 2E1 activity and elevated aldehyde dehydrogenase 2 activity, resulting in a lower serum acetaldehyde level compared with the alcohol control group. Chronic alcohol suppressed hepatic mRNA expression and activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase; however, they were reversed by scopoletin supplementation, which reduced hydrogen peroxide and lipid peroxide levels in the liver. These results indicate that dietary scopoletin attenuated chronic alcohol-induced insulin resistance and activated the antioxidant defense system through regulation of hepatic gene expression in glucose and antioxidant metabolism.

Key words: alcohol, antioxidant, insulin resistance, scopoletin

서 론

2013년 지역사회건강조사에 따르면 만 19세 이상 성인에 서 고위험음주율(1회 음주 시 남성은 7잔 이상, 여성은 5잔 이상을 주 2회 이상)은 2012년 16.1%에서 18.6%로 증가하 였을 뿐만 아니라 음주로 인한 의료비 지출은 해마다 꾸준히 증가하는 추세이다(1,2). 따라서 알코올에 의해 야기되는 질 병의 발병기전 이해는 보건문제 해결에 중요한 과제로 인식 되고 있다.

알코올 섭취에 따른 간조직의 인슐린저항성 및 DNA 손상 과 지질과산화로 인한 산화적 스트레스는 간손상을 일으키 며, 알코올성 간질환 환자의 당대사 이상은 흔히 당뇨병을

유발하는 것으로 알려져 있다(3). 만성적인 알코올 섭취는 간에서 인슐린 유사성장인자 신호전달 기전을 손상시켜 인 술린저항성을 유발하고 인슐린 분비를 감소시키는 것으로 보고되었다(4). 그러나 과량의 알코올이 인슐린 분비에 영 향을 미치기보다는 췌장에 직·간접 영향을 미쳐 인슐린저항성 을 유발하는 것으로 보고되면서(5) 현재까지 알코올이 인슐 린 분비에 미치는 영향은 상충되고 있다.

알코올은 간에서 알코올 탈수소효소와 알데히드 탈수소 효소에 의해서 산화되나(6) 과량 또는 만성적인 알코올 섭취 는 microsomal ethanol-oxidizing system(MEOS) 경로로 대사되어 간독성 물질인 아세트알데히드 생성량을 증가한 다(7). MEOS 반응계에서 cytochrome P450 2E1(CYP2E1) 이 중심적인 역할을 하는데, 이 효소는 알코올의 산화적 대 사반응에 관여하면서 라디칼 중간체나 활성산소 형성 및 지 질과산화를 일으켜 조직에 치명적인 손상을 일으킨다(7). 과 량의 아세트알데히드는 간독성을 촉진시킬 뿐만 아니라 혈 압저하와 뇌로의 혈액순환을 악화시켜 두통이나 메스꺼움,

Received 13 October 2014; Accepted 19 October 2014

Corresponding author: Mi-Kyung Lee, Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-950, Korea

E-mail: leemk@sunchon.ac.kr, Tel: +82-61-750-3656

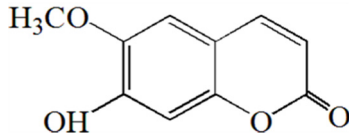


Fig. 1. Structure of scopoletin.

구토, 현기증, 설사, 근육통 등의 숙취 증상을 야기한다(8). 이러한 아세트알데히드 생성은 PI3K/Akt의 활성을 저해하여 세포 생존을 감소시킨다(4). 또한 알코올 자체가 직접적으로 지방간을 유도하거나 인슐린저항성을 통하여 지방간을 유도하게 되면 염증반응이 일어나서 결국 hepatocyte 손상을 초래하고 체내 활성산소종이 높아져 산화적 스트레스를 증가시킨다(9,10). 반면 알코올 독성으로부터 생성된 활성산소종에 대한 세포내 보호 물질로는 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSH-Px)와 같은 항산화 효소가 존재한다(11). 이들 효소계는 해독기능을 가지고 있어 활성산소를 물로 전환시켜 무독화시킨다(12).

Scopoletin(6-methoxy-7-hydroxycoumarin, Fig. 1)은 쿠마린(coumarin)계의 대표적인 물질로 더위지기(*Artemisia iwayomogi*), 노니(*Morinda citrifolia*), 뽕나무(*Ageratum conyzoides*)를 비롯한 다양한 식물에 함유되어 있다(13,14). Scopoletin은 혈압강하, 이뇨작용, 소염작용뿐만 아니라 HepG2 세포에서 인슐린저항성 개선, 항산화 효과 등이 보고되어 왔으나 정확한 기전 연구는 미비하다(15-17).

따라서 본 연구에서는 scopoletin의 수준별 식이보충이 만성 알코올을 급여한 흰쥐의 인슐린저항성, 알코올대사 및 항산화방어계에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 사육

실험동물은 4주령의 수컷 SD계 흰쥐 32마리를 오리엔트 바이오(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)로부터 구입하였다. 흰쥐는 1주간 고형식으로 적응시킨 후 난괴법에 의하여 정상군(Pair-fed), 알코올대조군(Alcohol), 알코올과 저농도의 scopoletin 급여군(Al-ScoL) 및 알코올과 고농도의 scopoletin 급여군(Al-ScoH)으로 나누었다. 동물사육실의 환경은 항온(20±2°C), 항습(50±5%), 12시간 간격(08:00~20:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고 동물들은 stainless steel cage에 한 마리씩 분리하여 사육하였다.

본 실험에 사용한 기본식은 Lieber와 DeCarli(Table 1)의 액체식이조성에 따라 1 mL당 1 kcal 열량을 공급할 수 있도록 조제하였다. 식이성분은 에탄올(36% 에너지)과 고지방(35% 에너지)으로 구성하였으며, scopoletin(TCI Co., Ltd., Tokyo, Japan)은 액체식이 리터당 0.01 g(저농도)과 0.05 g(고농도) 두 수준으로 첨가하여 공급하였다. 정상군의 액체식은 알코올 대신 텍스트린 말토오스를 동일

Table 1. Composition of the alcohol-liquid diet¹⁾
(g/L/1,000 kcal)

Component	Pair-fed	Alcohol	Al-ScoL	Al-ScoH
Casein	41.4	41.4	41.4	41.4
L-Cystein	0.5	0.5	0.5	0.5
D,L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn oil	8.5	8.5	8.5	8.5
Olive oil	31.1	31.1	31.1	31.1
Dextrin maltose	115.2 ²⁾	25.6	25.6	25.6
Choline bitartrate	0.53	0.53	0.53	0.53
Fiber	10.0	10.0	10.0	10.0
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral mixture ³⁾	2.55	2.55	2.55	2.55
Vitamin mixture ⁴⁾	9.0	9.0	9.0	9.0
Ethanol	—	50.0	50.0	50.0
Scopoletin	—	—	0.01	0.05

¹⁾The liquid diet was mixed in 1 L of distilled water.

²⁾The ethanol in the ethanol diet was replaced with additional dextrin maltose in the pair-fed group.

³⁾Mineral mixture according to AIN-76.

⁴⁾Vitamin mixture according to AIN-76.

한 열량이 되도록 첨가하였으며, 전날 알코올대조군이 섭취하는 동량을 공급하였다. 실험기간 중 식이조제는 각종 비타민 파괴와 오염방지를 위하여 매일 제조하여 신선한 상태로 공급하였으며, 에탄올을 포함한 액체식은 특수 고안된 액체 식이병에 채워 제공하였다. 에탄올의 식이 적응을 위해 급여 첫째 날과 둘째 날의 에탄올 함량은 식이의 3%(전체 에너지 섭취량의 21%), 셋째 날과 넷째 날은 식이의 4%(전체 에너지 섭취량의 28%), 그리고 다섯째 날부터는 식이의 5%(전체 에너지 섭취량의 36%)를 실험기간 8주 동안 공급하였다. 본 실험은 순천대학교 동물윤리위원회의 승인을 받아 실시하였다(SCNU-IACUC-2012-7).

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 CO₂ 가스를 흡입시켜 마취시킨 다음 복부 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 공복혈액을 채취하여 900×g에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 간조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 phosphate buffered saline 용액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거한 다음 즉시 액체질소로 급냉시켜 -70°C에 보관하였다.

혈청 중의 포도당과 인슐린 함량, 내당능 검사 및 인슐린 저항성 지표

혈청 포도당 함량은 혈당측정기(GlucoDr supersensor, Allmedicus, Anyang, Korea)를 이용하여 glucose oxidase 방법으로 측정하였으며, 인슐린 농도는 Morinaga ultra sensitive rat insulin ELISA kit(Miobs, Yokohama, Japan)을 사용하여 정량하였다. 인슐린저항성 지수(Homoeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)는 Haffner 등(18)의 식에 의하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucose (mmol/L)} \times \text{insulin (}\mu\text{IU/mL)} / 22.5$$

내당능 검사는 실험식이 급여 7주째 6시간 절식 후 포도당을 체중 kg당 2 g씩 경구 투여한 다음 0, 30, 60 및 120분 경과 후에 꼬리 채혈하여 혈당을 측정하였다.

혈청 중의 아세트알데히드 농도

혈청 중의 아세트알데히드 농도는 아세트알데히드가 알데히드 탈수소효소에 의해 산화되어 아세트산을 생성하는 과정에서 NAD^+ 라는 조효소의 도움을 받아 NADH를 생성하는데, 이때 생성된 NADH의 농도를 측정하는 원리로 제조된 kit(Roche Co., Darmstadt, Germany)을 사용하였다.

간조직 중의 RNA 분리 및 real-time PCR

총 mRNA 추출은 Trizol 시약으로 추출하여 정제하였으며, 분리한 mRNA는 Nano drop 1000(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 후 real-time PCR analysis를 수행하였다. Real-time PCR은 Chromo4 real-time PCR system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해서 수행하였으며, 각각의 PCR은 동일한 시료의 GAPDH 발현을 측정하여 보정하였다. 당대사와 관련한 유전자는 glucokinase(GK), glucose-6-phosphatase(G6Pase)와 phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)를 실행하였으며, 항산화대사와 관련한 유전자는 SOD, CAT와 GSH-Px를 측정하였다. Primer sequence는 다음과 같다. GK forward primer 5'-GATCATCGGTGGGAAGTATATGG-3', GK reverse primer 5'-CTCTTCAGCCACAGACAAGAA-3'; G6Pase forward primer 5'-GATAGACCAGCCCCGTGTAATG-3', G6Pase reverse primer 5'-GGAAGCAGTGATGAGTCCTATG-3'; PEPCK forward primer 5'-CTTCTCGGAGTCTGGAGAATAAAG-3', PEPCK reverse primer 5'-GTCTCTCTGCTCTTGGGTAATG-3'; SOD forward primer 5'-GGTCCACCTCGAACTACTTTATG-3', SOD reverse primer 5'-GGTGATCAGGAACATGGAATCT-3'; CAT forward primer 5'-CTCAGGTGCGGACATTCTATAC-3', CAT reverse primer 5'-GACTC-CATCCAGCGATGATTAC-3'; GSH-Px forward primer 5'-CAGTTCGGACATCAGGAGAATG-3', GSH-Px reverse primer 5'-AGCCATCACCAAGCCAATAC-3'; GAPDH forward primer 5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3', GAPDH reverse primer 5'-ACATACTCA-GCACCAGCATCACC-3'이었다.

간조직 중의 효소원 분리

간조직은 0.1 M triethanolamine, 0.02 M EDTA와 2 mM dithiothreitol이 포함된 완충용액(pH 7.4)을 가하여 균질기(Glas-col, Terre Haute, IN, USA)로 마쇄하여 얻은 균질액을 $900 \times g(4^\circ C)$ 에서 10분간 원심분리 하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상층액을 얻었다. 이를 $10,000 \times g$

($4^\circ C$)에서 20분간 원심분리 하여 미토콘드리아 분획을 취하였고 분리된 상층액을 $100,000 \times g(4^\circ C)$ 에서 1시간 초원심분리 하여 시토졸 분획을 취하였으며, 분리된 침전물은 동일 완충용액을 첨가하고 $100,000 \times g(4^\circ C)$ 에서 1시간 초원심분리 하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 미토콘드리아와 마이크로솜 침전물은 사용된 완충용액에 녹인 후 효소원으로 사용하였다. 조직의 효소 활성도는 Bradford(19) 방법을 사용하여 측정된 단백질 mg당의 고유활성도로 나타내었다.

간조직의 알코올대사 효소 활성도

Alcohol dehydrogenase(ADH) 활성도는 Bergmeyer(20)의 방법에 준하여 측정하였으며, aldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성도는 Koivula와 Koivusalo(21)의 방법에 준하여 측정하였다. 효소 활성도는 1분간 1 mg 단백질이 생성하는 NADH의 양을 nmol로 표기하였다.

간조직의 cytochrome P450 2E1(CYP2E1) 활성도

CYP2E1 활성도는 Dicker 등(22)의 방법에 준하여 aniline이 aniline hydroxylase에 의하여 생성되는 4-hydroxyaniline의 양을 측정하였다. 3.6 mM aniline과 450 μM NADPH 및 마이크로솜 시료를 potassium phosphate 완충액(pH 7.4)에 혼합한 후 $37^\circ C$ 에서 1시간 동안 반응시킨 다음 40% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 종결시키고 $14,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리 하여 상층액에 10% Na_2CO_3 와 2% phenol을 가한 후 실온에서 45분간 방치하여 발색시킨 다음 630 nm에서 흡광도를 측정하고 4-hydroxyaniline 검량선으로부터 활성도를 계산하였다.

간조직 중의 당대사 관련 효소 활성도

GK 활성도는 Davidson과 Arion(23)의 방법 및 Newgard 등(24)의 방법을 수정하여 측정하였으며 시토졸 단백질 1 mg당 1분간 생성되는 NADH의 nmol로 나타내었다. G6Pase 활성도는 Alegre 등(25)의 방법을 이용하여 1분간 마이크로솜 1 mg 단백질당 생성되는 NADH의 nmol로 나타내었다. PEPCK 활성도는 Bentle과 Lardy(26)의 방법을 수정·보완하여 측정하였으며 시토졸 단백질 1 mg당 1분간 생성된 oxaloacetate의 nmol로 나타내었다.

간조직 중의 PI3K 단백질 발현

간조직을 50 mM HEPES(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 1% Triton, 1 mM PMSF, 25 $\mu g/mL$ leupeptin과 2 μg aprotinin이 포함된 lysis 완충용액과 함께 분쇄기를 이용하여 균질화하였다. 균질액은 $4^\circ C$ 에서 30분간 혼합한 뒤 $12,000 \times g$ 로 1시간 동안 원심분리 한 후 상층액을 Bradford(19)의 방법에 따라 단백질을 정량하였다. 단백질 50 μg 을 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 후 nitrocellulose transfer membrane(GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont,

UK)으로 옮겼다. 그 후 0.1%의 Tween-20을 포함한 Tris 완충용액(TBST)으로 15분간 3회 세척한 후 5% BSA 용액으로 1시간 동안 실온에서 blocking 시켰다. p-PI3K(1:1,000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)의 1차 항체를 5% BSA 용액에 희석하여 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 다음날 TBST 완충용액으로 15분간 3회 세척한 후 세척한 membrane은 anti-rabbit IgG(1:10,000, Cell Signaling) 2차 항체를 이용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 TBST 완충용액으로 15분간 3회 세척한 후 ECL solution(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)을 이용하여 스캔하고 이미지 분석하였다. Membrane은 다시 TBST 완충용액으로 15분간 3회 세척한 후 stripping 완충용액(62.5 mM Tris, 2% SDS, pH 6.7)에 2-mercaptoethanol 700 μ L를 첨가하여 60°C에서 30분간 반응시킨 후 β -actin(1:200, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 p-PI3K와 동일한 방법으로 측정하였다. 단백질 발현은 β -actin으로 보정한 후 산출하였다.

간조직 중의 항산화 효소 활성화

SOD 활성은 Marklund와 Marklund(27)의 방법에 준하여 효소액을 넣지 않고 반응시킨 0.5 mM pyrogallol 용액의 자동산화율 50% 억제하는 정도를 나타내었다. CAT 활성은 Aebi(28)의 방법에 준하여 1분간 1 mg의 단백질에 의해 소실되는 과산화수소 양을 나타내었다. GSH-Px 활성은 Paglia와 Valentine(29)의 방법에 준하여 단백질 1 mg당 1분 동안 산화되는 NADPH 정도를 나타내었다.

간조직 중의 과산화수소 및 지질과산화물 함량

간조직의 과산화수소 함량은 Wolff 등(30)의 방법을 수정·보완하여 측정하였으며, 지질과산화물 함량은 Ohkawa 등(31)의 방법에 준하여 측정하였다. 지질과산화물의 지표 물질인 malondialdehyde(MDA) 함량은 tetramethoxypropane 표준검량선에 준하여 나타내었다.

통계처리

실험결과는 SPSS package 프로그램(SPSS statistics 21, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 표시하였고 각 군간 평균치의 통계적 유의성 검정은 one-way ANOVA를 실시하고 다군간의 차이는 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 포도당과 인슐린 함량, 내당능 검사 및 인슐린저항성 지표에 미치는 영향

8주간의 알코올 급여는 혈청 포도당 함량에는 영향을 미치지 않았으나 내당능 장애를 유발하였다(Fig. 2A-C). 내당능 검사는 식후 혈당 변화를 측정하는 것으로 간접적인 인슐린민감성 지표로 사용되는데 이를 혈당면적(AUC)으로 표현할 때 알코올대조군이 정상군에 비하여 20% 증가하였다. 그러나 scopoletin 저농도와 고농도 모두 유사한 수준으로 내당능을 개선하는 것으로 나타났다. 또한 인슐린저항성의 임상적 지표인 내당능 장애는 동물과 사람 대상 연구에서 알코올성 지방간을 야기하는 것으로 보고되었다(32). 이와

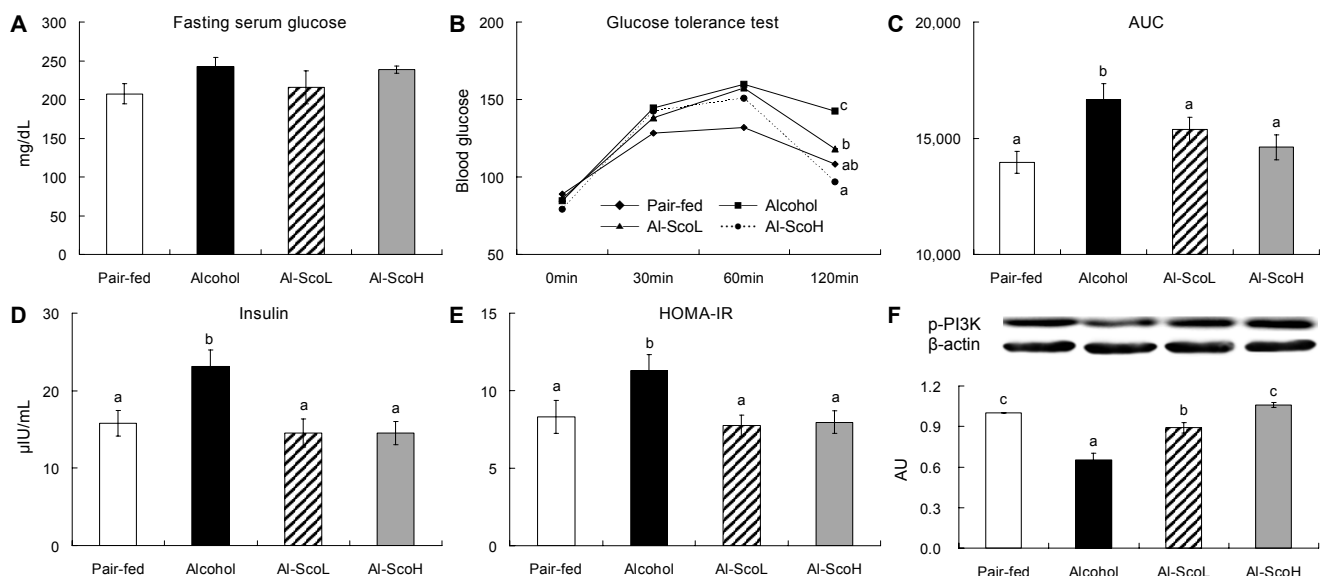


Fig. 2. Effect of scopoletin supplementation on fasting serum glucose level (A), oral glucose tolerance test (B), AUC (C), insulin level (D), HOMA-IR (E), and p-PI3K protein expression (F) in chronic alcohol-fed rats. Mean \pm SE (n=8). Means not sharing a common letter (a-c) above bars are significantly different among groups ($P < 0.05$). AUC, area under the curve of glucose tolerance test; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

같이 scopoletin은 만성 알코올을 섭취한 흰쥐의 인슐린 민감성을 증가시키는 것으로 사료된다.

따라서 인슐린저항성 지표를 살펴보기 위하여 혈청의 인슐린 함량을 측정하였다. 본 실험에서 만성 알코올 급여는 혈청의 인슐린 함량을 유의적으로 높임으로써 인슐린저항성 지표인 HOMA-IR이 정상군에 비하여 36% 상승하였다 (Fig. 2D & E). 만성 알코올이 인슐린저항성을 유발하는 것으로 알려져 있으나(4), 이는 인슐린 함량의 상승(33,34) 또는 저하(35,36) 때문이라는 상반된 의견들이 제시되고 있다. 인슐린저항성은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 이용하지 못하는 것으로 인슐린저항성이 유발되면 혈당이 높아지고 인체는 높은 혈당을 낮추기 위해 과다한 인슐린을 분비하여 고인슐린혈증, 당뇨, 고지혈증 및 지방간이 유발된다고 보고되어 있다(37). Cederbaum(38)은 알코올대사 과정에 생성되는 과량의 아세트알데히드가 인슐린저항성을 높여 지방간을 유발한다고 보고하였다. 본 실험에서도 혈청 중의 아세트알데히드 함량은 인슐린 함량과 양의 상관관계($r=0.592$, $P<0.01$)를 보였다. 이와 같이 두 급여수준의 scopoletin은 알코올에 의해 상승된 인슐린 농도를 개선함으로써 인슐린저항성을 개선하는 것으로 나타났다.

간조직 중의 PI3K 단백질 발현 및 당대사 효소의 유전자 발현과 활성에 미치는 영향

간조직에서 인산화된 PI3K는 Akt를 활성화시켜 당원분해와 당신생을 억제하여 포도당 생성을 낮출 뿐만 아니라 당의 흡수 및 항상성을 조절하는 것으로 알려져 있다(39). 그러므로 scopoletin이 간조직 중의 p-PI3K 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 알코올대조군은 활성화형인 p-

PI3K 발현을 정상군에 비하여 현저히 낮추었으나, scopoletin 보충으로 PI3K 활성은 유의적으로 개선되었으며 특히, 고농도군에서는 정상군과 유사한 수준이었다(Fig. 2F). 연구자들은 알코올 섭취가 간에서 당신생을 억제하는 p-PI3K 감소로 인슐린저항성이 발생하는 것으로 보고하고 있다(40). 따라서 본 실험에서 당신생 효소인 G6Pase 유전자 발현 및 활성을 측정한 결과, scopoletin 저농도군과 고농도군에서 알코올로 인하여 높아진 G6Pase의 유전자 발현을 낮추었으며, 효소 활성도 동일한 양상을 보여 각각 16%와 21% 감소하였다(Fig. 3). 또 다른 당신생 관련 효소인 PEPCK의 유전자와 효소 활성은 실험군 간에 차이가 없었다.

한편 간에서 포도당을 해당경로로 도입시키는 GK의 유전자 발현과 효소 활성은 저농도와 고농도 scopoletin 급여군 모두 알코올대조군에 비하여 유의적으로 높았다(Fig. 3). 간에서 GK가 활성화되면 혈당을 에너지 생산을 위해 사용하거나 글리코겐으로 저장하여 혈당이 감소하게 된다(41). 인슐린저항성 상태에서는 GK 활성이 현저하게 감소되는데 이는 당의 이용률 저하를 의미한다(42). 본 실험에서 GK/G6Pase 활성도 비는 저농도와 고농도의 scopoletin 급여군이 알코올대조군에 비하여 각각 1.7배와 2.5배 유의적으로 높게 나타났다. 이는 scopoletin이 p-PI3K 조절을 통해 당의 이용을 높이는 반면, 당신생을 억제하여 인슐린저항성을 개선하는 데 효과적이라고 사료된다.

혈청 중 아세트알데히드 함량 및 간조직 중의 알코올대사 효소 활성에 미치는 영향

Scopoletin이 알코올을 8주간 급여한 흰쥐의 혈청 아세트알데히드 함량 및 알코올대사에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 혈청 중의 아세트알데히드 함량은 알코올대조

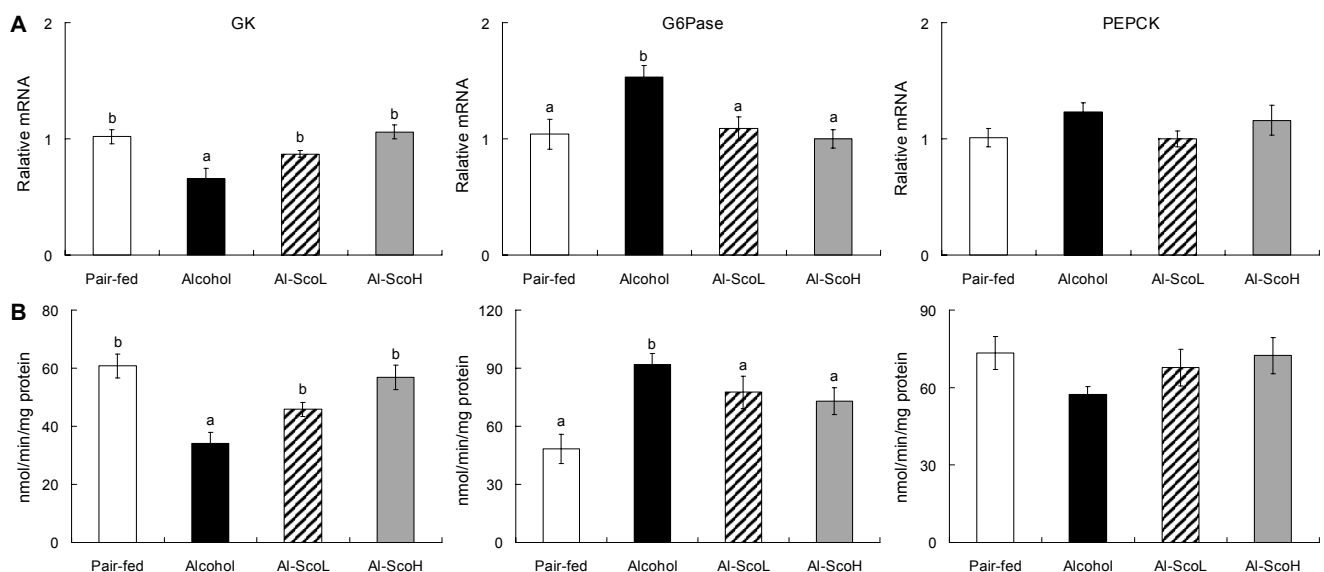


Fig. 3. Effect of scopoletin supplementation on hepatic glucose metabolic enzymes mRNA expression (A) and activities (B) in chronic alcohol-fed rats. Mean \pm SE (n=8). Means not sharing a common letter (a,b) above bars are significantly different among groups ($P<0.05$). GK, glucokinase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase.

Table 2. Effect of scopoletin supplementation on serum acetaldehyde level and hepatic alcohol metabolic enzyme activities in chronic alcohol-fed rats¹⁾

	Pair-fed	Alcohol	Al-ScoL	Al-ScoH
Serum acetaldehyde (mg/L)	3.16±0.17 ^{a2)}	4.59±0.33 ^b	3.81±0.22 ^a	3.21±0.13 ^a
ADH (nmol/min/mg protein)	3.16±0.33 ^a	3.05±0.18 ^a	3.24±0.20 ^a	4.29±0.28 ^b
ALDH (nmol/min/mg protein)	6.82±0.26 ^b	4.67±0.43 ^a	6.82±0.26 ^b	7.50±0.54 ^b
CYP2E1 (μmol/min/mg protein)	8.60±0.98 ^a	30.99±2.29 ^d	25.06±1.38 ^c	18.65±1.81 ^b

¹⁾Mean±SE (n=8).

²⁾Means in the row not sharing a common letter (a-d) are significantly different among groups ($P<0.05$). ADH, alcohol dehydrogenase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; CYP2E1, cytochrome P450 2E1.

군에 비하여 scopoletin 저농도군과 고농도군에서 각각 17%와 30%의 유의적인 개선 효과를 보였다. 아세트알데히드는 단기적으로는 뇌에 영향을 미쳐 숙취를 일으키는 원인이며 장기적으로는 미토콘드리아 기능을 저해하고 ALDH 활성을 낮추어 알코올성 간염과 간경화 등을 유발한다(43).

또한 아세트알데히드에 의한 미토콘드리아 기능 상실과 산화적 스트레스는 체장의 β-세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있다(4). 알코올은 ADH에 의해 아세트알데히드로 전환되고 이는 ALDH에 의해 아세트산(acetic acid)으로 산화된다. 아세트산은 아세틸-CoA로 전환되어 구연산회로를 거쳐 에너지를 발생하거나 지방산을 합성하는 데 이용되고 일부는 요나 CO₂로 배설된다(44). 그러나 만성적 혹은 과량으로 알코올을 섭취하게 되면 ADH 경로가 아닌 MEOS 경로를 통해 대사하게 되는데 이때 CYP2E1 활성이 높아진다(45). 본 실험에서 ADH 효소 활성은 고농도 scopoletin군에서만 알코올대조군에 비해 유의적으로 높았으나, CYP2E1 활성은 알코올대조군에 비하여 저농도와 고농도 scopoletin 급여군에서 각각 19%와 40%로 낮았다. 이는 8주간 과량의 알코올대사는 ADH 활성보다 CYP2E1 활성에 의존하는 것으로 사료된다. CYP2E1은 산소분자에 전자를 제공하는 전

자전달계 역할의 헴단백질로 특히, 간조직에 다량으로 존재하고 있다(46). 그러나 CYP2E1은 알코올의 산화적 대사과정에서 라디칼 중간체나 활성산소 형성 및 지질과산화반응을 일으켜 간에 치명적인 손상을 미친다(47). 따라서 scopoletin 저농도와 고농도 급여군 모두 CYP2E1의 활성을 유의적으로 억제하여 알코올대사 과정에 생성되는 활성산소 또는 지질과산화물 생성을 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 반면 간조직의 ALDH 활성은 두 scopoletin 농도군 모두 알코올대조군에 비해 각각 약 46%와 60%로 유의적으로 높았다. ALDH 활성은 알코올 산화 시 생성되는 아세트알데히드 대사를 빠르게 대사하여 아세트산으로 전환하는 데 관여하므로(48), scopoletin 급여는 ALDH의 활성을 높여 아세트알데히드 함량을 낮출 뿐만 아니라 인슐린저항성 개선을 유도하는 것으로 사료된다.

간조직 중의 항산화방어계와 지질과산화물 함량에 미치는 영향

만성 알코올 섭취에 의해 증가된 CYP2E1의 산화과정에서 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 혈관내피세포 및 미토콘드리아에 손상을 일으키고(49),

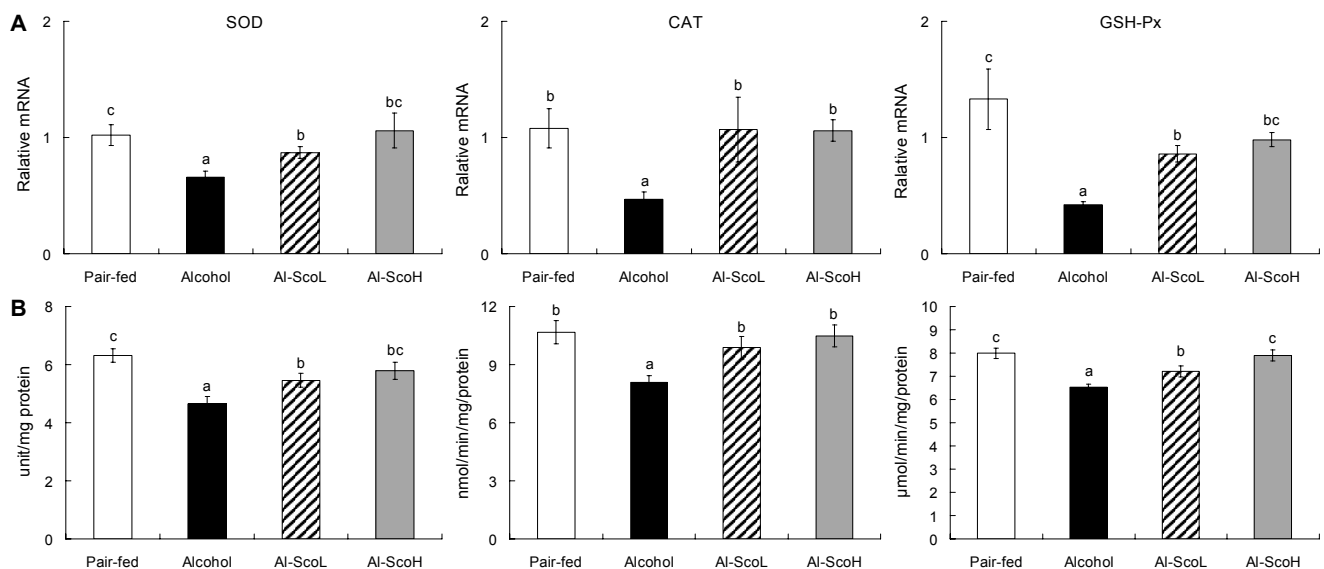


Fig. 4. Effect of scopoletin supplementation on hepatic antioxidant metabolic enzymes mRNA expression (A) and activities (B) in chronic alcohol-fed rats. Mean±SE (n=8). Means not sharing a common letter (a-c) above bars are significantly different among groups ($P<0.05$). SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase.

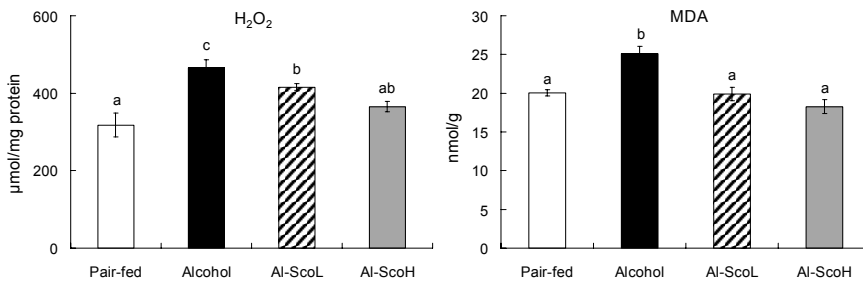


Fig. 5. Effect of scopoletin supplementation on hepatic H₂O₂ and lipid peroxide concentrations in chronic alcohol-fed rats. Mean±SE (n=8). Means not sharing a common letter (a-c) above bars are significantly different among groups ($P<0.05$). H₂O₂, hydrogen peroxide; MDA, malondialdehyde.

이는 산화적 스트레스를 유도한다(50). Kathirvel 등(51)은 CYP2E1을 과발현시킨 동물에서 산화적 스트레스와 인슐린저항성이 유도되는 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 scopoletin이 알코올로 인한 산화적 스트레스를 방어하는 항산화 효소의 유전자 발현과 활성을 측정하였다(Fig. 4).

SOD, CAT와 GSH-Px는 체내 유리기로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하는 항산화 효소로(45) 활성산소에 대한 자가방어 기능을 수행한다. SOD의 유전자 발현과 활성도는 알코올대조군이 정상군에 비해 유의적으로 낮았으나, scopoletin 급여군에서 높아졌으며 고농도군이 보다 효과적이었다. 생성된 과산화수소(H₂O₂)를 물로 무독화하는 CAT와 GSH-Px의 유전자 발현과 효소 활성 역시 알코올 급여로 낮아졌으나 두 scopoletin 급여군에서 회복되었다. SOD는 알코올이 아세트알데히드와 아세트산으로 산화될 때 생성되는 O₂^{·-}과 같은 자유라디칼을 환원시켜 과산화수소로 전환함으로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 역할을 하는데(45), scopoletin은 알코올에 의해 낮아진 SOD를 유의적으로 높여 O₂^{·-}을 빠르게 과산화수소로 전환하였으며, CAT와 GSH-Px 활성을 증가시켜 과산화수소 함량을 알코올대조군에 비해 유의적으로 낮추었다(Fig. 5).

만성적인 알코올 섭취는 세포막 수준에서 활성 유리기를 생성시켜 지질과산화물을 형성한다고 보고되어 있다(52). 지질과산화는 생체 내에서 자연적으로 발생할 수 있는 여러 가지 유리라디칼에 의해 세포막의 다가 불포화지방산이 과산화되는 현상으로 지질과산화물의 반응이 촉진되면 세포의 산화적 손상, 생리적 기능 저하에 의한 간질환이 발생하는 것으로 알려져 있다(53). 본 연구에서도 8주간의 알코올 급여는 간조직의 지질과산화물 생성을 유의적으로 증가시켰으나, 두 농도의 scopoletin은 지질과산화물을 유의적으로 낮춤으로써 간세포의 산화적 손상을 예방할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 5).

요 약

본 연구는 scopoletin 식이 보충이 알코올로 인해 유발되는 인슐린저항성과 항산화방어계에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. 실험동물은 4주령의 수컷 SD계 흰쥐에게 총 열량의 36%에 해당하는 알코올을 액체식이 형태로 8주간 공급하였으며, scopoletin은 알코올 액체식이 리터당 0.01 g과 0.05

g 두 수준으로 첨가하였다. 정상군은 알코올대조군과 동량의 에너지를 섭취하도록 하였다. 8주간의 알코올 급여는 공복 시 혈당 변화를 일으키지 않았으나 혈청 인슐린 함량을 증가시켰으며, 이는 인슐린저항성과 내당능 장애를 유발하였다. 그러나 scopoletin 저농도와 고농도 급여군 모두 인슐린 함량, 인슐린저항성 지표 및 내당능을 효과적으로 개선하는 것으로 나타났다. 알코올대조군은 p-PI3K의 단백질 발현을 유의적으로 낮추어 glucokinase 유전자 발현과 활성을 억제한 반면, 당신생 효소인 glucose-6-phosphatase의 유전자 발현과 활성을 유의적으로 높였다. 그러나 scopoletin 급여에 의하여 이들 변화는 완화되었다. 다른 당신생 효소인 phosphoenolpyruvate carboxykinase의 유전자 발현과 활성에는 영향을 미치지 않았다. 또한 scopoletin 급여군 모두 간조직의 aldehyde dehydrogenase의 활성은 알코올대조군에 비해 증가된 반면, cytochrome P450 2E1 활성은 억제되었다. 또한 알코올로 인하여 낮아진 간조직 중의 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase와 glutathione peroxidase)의 유전자 발현과 활성을 높임으로써 과산화수소 및 지질과산화물의 함량을 낮추었다. 이와 같이 0.001%의 scopoletin 급여량에서도 당대사의 유전자 변화를 통하여 만성 알코올로 유도되는 인슐린저항성을 개선하였으며, 알코올대사계 활성 및 항산화방어계 효소의 유전자 발현을 증가함으로써 알코올로 인한 과산화수소와 지질과산화물 생성을 개선하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2012년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업이며(No. 2012R1A1A2041931), 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ministry of Health and Welfare. 2014. *Community health survey*. Korea Centers for Disease Control and Prevention, Osong, Korea. p 68-74.
2. Lee SM, Yun YD, Hyun KR, Lee EM. 2012. *Health insurance & policy*. National Health Insurance Service, Seoul, Korea. p 179-190.
3. de la Monte SM, Yeon J, Tong M, Longato L, Chaudhry R, Pang MY, Duan K, Wands JR. 2008. Insulin resistance

- in experimental alcohol-induced liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 23: e477-e486.
4. de la Monte S, Derdak Z, Wands JR. 2012. Alcohol, insulin resistance and the liver-brain axis. *J Gastroenterol Hepatol* 27: 33-41.
 5. Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. 2012. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and beta-cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol* 214: 11-20.
 6. Linder MC. 1991. *Nutritional biochemistry and metabolism: with clinical applications*. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam Oxford, NY, USA. p 79-83.
 7. McDonough KH. 2003. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology* 189: 89-97.
 8. Choi JY, Kim JH, Kim G, Kim CK, Choi MS. 2014. Effect of fermented *Hovenia dulcis* Thunb fruit water extract on biomarker for liver injury and body weight changes in rats given oral administration of ethanol. *Korean J Food Preserv* 21: 412-420.
 9. Kuwahara K, Kochi T, Nanri A, Tsuruoka H, Kurotani K, Pham NM, Akter S, Kabe I, Mizoue T. 2014. Flushing response modifies the association of alcohol consumption with markers of glucose metabolism in Japanese men and women. *Alcohol Clin Exp Res* 38: 1042-1048.
 10. Lindtner C, Scherer T, Zielinski E, Filatova N, Fasshauer M, Tonks NK, Puchowicz M, Buettner C. 2013. Binge drinking induces whole-body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action. *Sci Transl Med* 5: 170ra14.
 11. Cho BS, Lee JJ, Lee MY. 2007. Effects of ethanol extracts from *Petasites japonicus* S. et Z. max. on hepatic antioxidant systems in alcohol treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 298-304.
 12. Park YS. 2010. Antioxidant effects and improvement of lipid metabolism of *Acanthopanax cortex* water extract in rats fed high fat diet. *J East Asian Soc Dietary Life* 20: 37-45.
 13. Pachauri SD, Tota S, Khandelwal K, Verma PR, Nath C, Hanif K, Shukla R, Saxena JK, Dwivedi AK. 2012. Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: a behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *J Ethnopharmacol* 139: 34-41.
 14. Matsumoto S, Mizutani M, Sakata K, Shimizu B. 2012. Molecular cloning and functional analysis of the *ortho*-hydroxylases of p-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea Batatas* (L.) Lam. *Phytochemistry* 74: 49-57.
 15. Moon PD, Lee BH, Jeong HJ, An HJ, Park SJ, Kim HR, Ko SG, Um JY, Hong SH, Kim HM. 2007. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the IkappaB/NF-kappaB signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur J Pharmacol* 555: 218-225.
 16. Ding Z, Dai Y, Wang Z. 2005. Hypouricemic action of scopoletin arising from xanthine oxidase inhibition and uricosuric activity. *Planta Med* 71:183-185.
 17. Shaw CY, Chen CH, Hsu CC, Chen CC, Tsai YC. 2003. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomenium acutum*. *Phytother Res* 17: 823-825.
 18. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. 1997. The homeostasis model in the San Antonio heart study. *Diabetes Care* 20: 1087-1092.
 19. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
 20. Bergmeyer HU. 1974. *Method of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, NY, USA. p 28.
 21. Koivula T, Koivusalo M. 1975. Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim Biophys Acta* 397: 9-23.
 22. Dicker E, McHugh T, Cederbaum AI. 1990. Increased oxidation of p-nitrophenol and aniline by intact hepatocytes isolated from pyrazole-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1035: 249-256.
 23. Davidson AL, Arion WJ. 1987. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch Biochem Biophys* 253: 156-167.
 24. Newgard CB, Hirsch LJ, Foster DW, McGarry JD. 1983. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? *J Biol Chem* 258: 8046-8052.
 25. Alegre M, Ciudad CJ, Fillat C, Guinovart JJ. 1988. Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose dehydrogenase-coupled reaction. *Anal Biochem* 173: 185-189.
 26. Bentle LA, Lardy HA. 1976. Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 251: 2916-2921.
 27. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
 28. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
 29. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
 30. Wolff SP. 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 233: 182-189.
 31. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
 32. Carr RM, Dhir R, Yin X, Agarwal B, Ahima RS. 2013. Temporal effects of ethanol consumption on energy homeostasis, hepatic steatosis, and insulin sensitivity in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 37: 1091-1099.
 33. Huang Z, Sjöholm A. 2008. Ethanol acutely stimulates islet blood flow, amplifies insulin secretion, and induces hypoglycemia via nitric oxide and vagally mediated mechanisms. *Endocrinology* 149: 232-236.
 34. Macho L, Zorad S, Radikova Z, Patterson-Buckedahl P, Kvetnansky R. 2003. Ethanol consumption effects stress response and insulin binding in tissues of rats. *Endocr Regul* 37: 195-202.
 35. Nguyen KH, Lee JH, Nyomba B. 2012. Ethanol causes endoplasmic reticulum stress and impairment of insulin secretion in pancreatic β -cells. *Alcohol* 46: 89-99.
 36. Lee Y. 2004. Effect of large amount of alcohol intake on insulin secretion in non-obese NIDDM rats. *MS Thesis*. Yonsei University, Seoul, Korea.
 37. Jang SM, Kim MJ, Choi MS, Kwon EY, Lee MK. 2010. Inhibitory effects of ursolic acid on hepatic polyol pathway and glucose production in streptozotocin-induced diabetic mice. *Metabolism* 59: 512-519.
 38. Cederbaum AI. 2001. Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radic Biol Med* 31: 1524-1526.

39. Han JW, Zhan XR, Li XY, Xia B, Wang YY, Zhang J, Li BX. 2010. Impaired PI3K/Akt signal pathway and hepatocellular injury in high-fat fed rats. *World J Gastroenterol* 16: 6111-6118.
40. Shulman GI. 2004. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology* 19: 183-190.
41. Postic C, Shiota M, Magnuson MA. 2001. Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 56: 195-217.
42. Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, Kim KS, Ahn YH. 2004. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem* 279: 30823-30829.
43. Farfán Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez-Quiroz LE, Feinstein MK, Bucio L, Souza V, Flores O, Ortíz V, Hernández E, Kershenovich D. 2009. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biol Toxicol* 25: 599-609.
44. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Gardi C, Ciccoli L, Giardini A, Vecchio D, Arezzini B. 2010. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr* 5: 101-109.
45. Lee HI, Seo KI, Lee J, Lee JS, Hong SM, Lee JH, Kim MJ, Lee MK. 2011. Effect of fermented cucumber beverage on ethanol metabolism and antioxidant activity in ethanol-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1099-1106.
46. Dey A, Cederbaum AI. 2006. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 43: S63-74.
47. Gaudineau C, Beckerman R, Welbourn S, Auclair K. 2004. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 1072-1078.
48. Sha K, Choi SH, Im J, Lee GG, Loeffler F, Park JH. 2014. Regulation of ethanol-related behavior and ethanol metabolism by the corazonin neurons and corazonin receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 9: e87062.
49. Jeon CM, Jeong JC. 2007. Effects of iksujisundan on renal function, peroxynitrite scavenging activity and polyol pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oriental Med* 28: 237-248.
50. Park DB. 2010. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *J Korean Soc Pediatr Endocrinol* 15: 77-84.
51. Kathirvel E, Morgan K, French SW, Morgan TR. 2009. Overexpression of liver-specific cytochrome P450E1 impairs hepatic insulin signaling in a transgenic mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21: 973-983.
52. Lee EH, Chyun JH. 2009. Effects of chongkukjang intake on lipid metabolism and liver function in alcoholic fatty liver rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1506-1515.
53. Lee SJ, Kang MJ, Shin JH. 2013. Effect of black garlic and mugwort extracts on lipids profile during restraint stress. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 577-586.