

Streptozotocin에 의해 유도된 당뇨쥐에서 연교의 에탄올 추출물의 당뇨 개선 효과

김옥경[†]

[†]대진대학교 자연과학대학 식품영양학과
(2015년 5월 10일 접수; 2015년 5월 22일 수정; 2015년 5월 22일 채택)

Antidiabetic Effect of *ethanol extract of Forsythia Koreana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat

Ok-Kyung Kim[†]

[†]Department of Food Science and Nutrition, Dae Jin University,
Pochon 487-711, Korea

(Received May 10, 2015; Revised May 22, 2015; Accepted May 22, 2015)

요약 : Streptozotocin(STZ)으로 유도된 당뇨 흰쥐에게 연교의 에탄올 추출물을 1일 1회 7일간 1,000mg/kg.b.w의 용량으로 투여 후 glucose함량과 이에 관여하는 효소(glucokinase(GK), glucose-6-phosphatase(G-6-Pase), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH)활성과 glycogen 함량, triglyceride(T.G), total cholesterol등의 지질대사에 관여하는 물질들의 함량을 측정된 결과 연교 에탄올 추출물 투여군이 glucose, T.G, total cholesterol 등의 함량과 G-6-Pase 활성이 유의적인 감소를 나타내었으며 glycogen 함량과 GK의 활성이 유의적인 증가를 나타내었다. 이와 같이 연교 에탄올 추출물을 1,000mg/kg.b.w을 당뇨 흰쥐에게 투여한 결과 혈당저하, 지질대사의 개선 효과를 갖는 유효성분을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

Abstract : This study was carried to investigate the antidiabetic effect of ethanol extract in Streptozotocin(STZ)-induced diabetic rats. Diabetes was induced by intravenous injection of STZ at a dose of 45mg/kg dissolved in citrate buffer. The ethanol extract of *Forsythia Koreana*(F.K) was orally administrated once a day for 7 days at a dose of 1,000mg/kg. The contents of serum glucose, triglyceride(TG), total cholesterol were significantly decreased in F.K treated group compared to the those of STZ-control group. The content of hepatic glycogen and activity of glucokinase(GK) were significantly increased, and activity of glucose-6-phosphatase(G-6-Pase) was significantly decreased in F.K treated group compared to the those of STZ-control group, but activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH) was not significantly increased, These results indicated that ethanol extract of F.K would have antidiabetic effect in STZ-induced diabetic rats.

Keywords : streptozotocin, triglyceride, total cholesterol, antidiabetic effects, *Forsythia Koreana*(F.K)

[†]Corresponding author (E-mail: okkim@daejin.ac.kr)

1. 서론

당뇨병(Diabetes mellitus)은 최근 소득 증가와 함께 증가일로에 있는 생활습관병으로 이병 자체의 문제보다도 심장병, 신장장애, 말초순환장애, 백내장 등을 비롯한 여러 가지 합병증으로 많은 사람들에게 고통을 주고 있다. 당뇨에는 인슐린 분비부족으로 오는 1형과 인슐린 저항성과 분비의 상대적인 결핍으로 인한 2형이 있다. 우리나라는 2형의 당뇨가 전체의 90~95%를 차지하고 있는 실정이지만 현재 사용하고 있는 치료 약물이 완치를 지향하고 있지 못하는 실정이다. 현대 의학으로 당뇨병의 근원을 치료할 수 있는 방법은 아직 개발되지 못했다. 현재 알려진 최선의 치료 방법은 정상적인 혈당의 수준을 유지하는 것이며, 이는 약물요법, 운동요법, 식이요법의 3가지 방법을 이용할 수 있다[1] 따라서 21세기가 지향하고 있는 예방의학이라는 시대적 조류에 따라 전승의학 개념의 천연물을 통한 당뇨예방에 도움을 줄 수 있는 기능성 식품개발의 기초 자료를 탐색하고자 연교를 선택하여 흰쥐를 통한 항당뇨성을 검토하고자 하였다.

연교(Forsythia Koreana Nakai)는 물푸레나무과의 낙엽성 소교목으로, 의성개나리 및 동속식물의 열매 각지로 중국과 한국의 의성에서 재배되고 있으며 항균작용과 항염증 및 혈압강하 작용 등이 알려져 있다[2]. 한편 생리활성 연구로는 Choi등[3], Kim등[4]의 항알러지작용, Jung등[5]의 항염증작용이 보고 되었으며, 성분으로는 lignans(phylligenin, phillyrin, pinoresinol과 bisopoxylignans), cyclohexyloethanolid, rengylone, flavonoids, sterol, catteoyl, glucosides와 terpenes 등이 보고[6]되었다. 따라서 본 논문에서는 개나리 열매 껍질인 연교의 Ethanol 추출물을 STZ로 유발된 당뇨 흰쥐에게 7일간 경구투여하여 혈당강하와 Triglyceride (TG), Total-cholesterol, HDL-cholesterol 등의 지질함량 변화와 간조직의 Glycogen함량 및 당대사에 관여하는 효소인 Glucose-6-phosphate dehydrogenase(Glucose-6-PDH), glucose-6-phosphatase(Glucose-6-Pase), Glucokinase(GK)를 측정하여 연교의 항 당뇨효과에 대한 기초적인 자료를 얻고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시료, 시약 및 기기

본 실험에 사용한 연교는 2013년 서울 경동 약령시장에서 구입(경남 거창산)하였으며 시약 및 기기는 Kim[7]의 방법에 따라 사용하였다.

2.2. 추출 실험

건조시킨 연교 200g을 95% Ethanol로 4시간씩 3번 95°C에서 가열 추출한 후 여액을 감압농축하였다.

2.3. 실험동물사육, 당뇨유발 및 검액의 조제

Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐(rat)를 (주)오리엔트 바이오에서 구입하여 일주일간 고행사료((주) 삼양사)를 먹여 사육장 환경에 적응시킨 후 220g±15g의 흰쥐를 하룻밤 동안 절식시킨 후 췌장의 β -cell 에만 선택적으로 작용하여 당뇨를 유발하는 Streptozotosin(STZ)을 45 mg/kg (b.w) 용량으로 0.01M citric acid buffer(pH 4.5)에 녹여 2 ml/kg(b.w) 용량으로 미정맥 주사를 하였다. STZ 주사 48시간이 경과한 후 안와 정맥으로 부터 혈액을 채취하여 혈당이 300mg/dl 이상인 것을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 5마리씩 당뇨 유발 대조군(STZ-Control), 당뇨 유발 실험군(STZ-Sample)으로 나누었으며 정상군과 당뇨 유발 대조군은 0.5% CMC를, 당뇨 유발 실험군에는 연교의 Etanol 추출물을 1,000mg/kg, b.w.의 용량으로 0.5% CMC 용액에 현탁시켜 10 ml/kg, b.w.씩 1일 1회 7일간 경구투여 하였다.

2.4. 효소원 조제 및 분석

혈청중의 glucose, TG, 총콜레스테롤 함량과 간조직 중의 glycogen함량과 당대사를 위한 glucose-6-phosphatase(G-6-pase), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH), glucokinase(GK) 측정은 Kim[7]과 같은 방법으로 측정하였다.

2.5. 통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준± 표준 오차로 계산하였고, 각 군간의 차이는 Student's t-test를 실시하여 p값이 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 연교 에탄올 추출물

연교 200 g 을, 에탄올 1,000 ml에 넣고 4시간 씩 3회 추출 후 일반 여과지에서 여과한 후, 회전 농축기에서 농축하여 30.9 g (수율15.5 %)의 에탄올 추출액을 얻었다.

3.2. 혈당 저하 효과

혈청내의 혈당저하 효과는 Table 1과 같다. 정상군의 혈당치가 125.20±20.29 mg/dL에 비해 당뇨 대조군은 535.60±29.47 mg/dL으로 유의적인 증가를 나타내었으나 연교 에탄올 추출물 1,000 mg/kg을 투여한 군에서는 347.13±20.24 mg/dL로 유의적인 감소를 나타내었다.

3.3. 지질성분 함량분석

당뇨 흰쥐에게 추출물 투여 후 지질함량의 변화는 Table 2와 같다. 혈중 t.g 농도는 당뇨대조군이 768.34±147.96 mg/dL로 정상군의 125.70±9.15 mg/dL보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 당뇨 유발시 insulin분비의 감소로 very low density lipoprotein(VLDL)생성이 증가되고, 말초조직에서의 lipoprotein lipase활성이 저하되어 VLDL과 chylomicron대사가 원활히 이루어지지 않기 때문[8]이다. 반면에 추출물 투여군은 367.09±116.64 mg/dL 으로 당뇨대조군과 비교하여 유의적으로 낮게 나타나 혈중t.g 농도 감소에 효과가 있음을 알 수 있었다. 혈중 total cholesterol 농도는 당뇨대조군이 107.35±18.92 mg/dL로 정상군의 75.36±5.04 mg/dL 보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 당뇨 유발시 체내에 당대사가 정상적으로 이루어지지 않아 간내의 hydroxy methyl glutaryl-coA(HMG-CoA)

Table 1. The serum glucose level of normal and diabetic rats fed on ethanol extract of *Forsythia Koreana*

Experimental group	Dose(mg/k.g,B.W,p.o)	Glucose((mg/dL)
Normal	-	125.20±20.29 ¹⁾
STZ ²⁾ -control	-	535.60±29.47 [#]
STZ+F.K ³⁾	1000	347.13±20.24 [*]

¹⁾Values are the mean±S.E.(n=5)

²⁾Streptozotocin(45mg/kg, b.w) [0.01M citric acid buffer(pH 4.5)] was i.p. injected into the tail vein. [#]Significantly different from normal at p<0.05, ^{*}Significantly different from STZ-control at p<0.05 by student's *t*-test.

³⁾The ethanol extract of *Forsythia Koreana* was administrated orally once a day in experimental rats for 7 days.

Table 2. The effect of ethanol extract of *Forsythia Koreana* on the level of serum T.G, total cholesterol, HDL-cholesterol in streptozotocin induced diabetic rats

Experimental group	Dose (mg/kg,B.W,p.o)	Triglyceride (TG)	Total cholesterol	HDL-cholesterol
		(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Normal	-	125.7±9.15 ¹⁾	75.36±5.04	122.06±7.30
STZ ²⁾ -control	-	768.34±147.36 [#]	107.35±18.92 [#]	65.81±8.95 [#]
STZ+ F.K ³⁾	1000	367.09±116.64 [*]	73.12±7.50 [*]	72.10±14.10

^{1,2,3)} :See the legend of Table 1.

reductase활성이 감소되고 장내의 HMG-CoA활성 증가에 기인한다[9]. 추출물 투여시 당뇨대조군보다 낮게 나타났지만 유의성은 없었다. HDL-cholesterol의 경우 당뇨 대조군이 정상군보다 유의적으로 낮게 나타났다. 이는 당뇨 유발시 lipoprotein lipase 활성 저하로 인한 지단백질 분해의 감소로 HDL-cholesterol 생성이 억제되기 때문이다[10]

3.4. Glycogen 함량

간 조직중의 glycogen 함량은 Table 3 과 같다. 정상군의 glycogen 함량은 753.16 ± 111.78 mg/g of tissue인 것에 비해 당뇨대조군은 103.82 ± 11.84 mg/g of tissue로 유의적으로 낮았다. 이는 당뇨유발시 insulin분비 장애가 나타나 간에서 glycogen 합성에 관여하는 glycogen synthase가 glycogen synthase phosphatase로 활성이 저하되어 간 조직내의 glycogen함량이 감소되기 때문이다[11] 한편 추출물 투여군에서 glycogen함량이 312.59 ± 48.12 mg/g로 당뇨대조군과 비교하여 유의적인 증가를 나타내었는데, 이것은 Table 1의 혈당저하 실험에서 당뇨대조군과 비교하여 추출물 투여시 유의적으로 혈당치를 감소시킨 결과 간의 glycogen 함량을 증가시킨 것으로 사료된다.

3.5. 당대사관련 효소활성 측정

가. G-6-Pase 활성

G-6-Pase활성은 Table 4와 같다. g-6-Pase는 microsome에 존재하는 막부착효소로서[12] 탄수화물 대사에 중요하게 작용, 특히 이것은 glycerol의 분해 및 포도당 신생작용의 촉매 효소이며 cyclic AMP, glucocorticoids, glucose,

fatty acid 및 간 췌장 부분의 절개에 의해 억제된다[13] 특히 STZ투여는 g-6-pase mRNA의 발현을 증가시키고 그 결과 당뇨병에서 g-6-pase활성을 증가시키며 고혈당과 함께 혈장의 protein kinase 활성도와 insulin 농도를 감소시킨다는 보고[14]에 따라 본 실험에서도 당뇨유발로 인해 정상군과 비교하여 유의적인 증가를 나타내었으나 추출물 투여로 인해 유의적인 감소를 나타내었다.

나. G-6-PDH 활성

G-6-PDH의 활성은 Table 4와 같다. g-6-pdh는 glucose 대사 과정의 pentose phosphate pathway로 들어가는 최초 과정에 관여하는 효소이며, 또한 gsh-px가 gssg를 gsh로 환원시키는데 필요한 NADPH를 생성하는 효소로서 작용[15] 하지만, 본 실험에서는 어떤 활성도 나타내지 못하였다.

다. GK 활성

GK활성은 Table 4와 같다. gk는 당대사의 항상성 유지에 관여하고 insulin에 의해 조절되며, 특히 당뇨병 유발시에 gk 활성 감소가 특징적으로 나타나며, 활성 감소 시 당대사 이용율을 저하시킨다는 보고[16]에 따라 본 실험에서도 정상군과 비교하여 당뇨대조군에서도 감소를 나타내었으나 추출물 투여군에서 당뇨대조군과 비교하여 증가를 보였다.

4. 결론

본 연구는 STZ로 유발된 당뇨 흰쥐에게 연교 에탄올 추출물의 혈당저하, 지질 및 당대사, 작용을 분석 한 결과는 다음과 같았다.

Table 3. The content of hepatic glycogen in normal and diabetic rats fed on ethanol extract of *Forsythia Koreana*

Experimental group	Dose (mg/kg,B,W,p.o)	Glycogen ¹⁾
Normal	-	$753.16 \pm 111.78^{2)}$
STZ ³⁾ -control	-	$103.82 \pm 11.84^{\#}$
STZ + MT ⁴⁾	1,000	$312.59 \pm 48.12^*$

¹⁾mg/g of tissue ^{2,3,4)}#,* : See the legend of Table 1

Table 4. The cytosolic glucose-6-pase, glucose-6-pdh, gk activities of normal and diabetic rats fed on ethanol extract of *Forsythia Koreana*

Experimental group	Dose (mg/kg,B.W, p.o)	Glucose-6-Pase ¹⁾	Glucose-6-PDH ²⁾	Glucokinase ³⁾
Normal	-	7.51±0.26 ⁴⁾	0.03±0.01	0.22±0.04
STZ ⁵⁾ -control	-	13.74±0.52 [#]	0.01±0.01	0.02±0.01 [#]
STZ + MT ⁶⁾	1000	6.75±0.14 [*]	0.02±0.03	0.24±0.09 [*]

¹⁾Glucose-6-phosphatase: nmoles/mg/protein/min

²⁾Glucose-6-phosphatedehydrogenase: moles/mg/protein/min,

³⁾nmoles/mg/protein/min

^{4,5,6)} : See the legend of Table 1.

1. STZ 투여로 증가된 혈당치와 TG 함량이 추출물 투여에 의해 유의적인 감소를 나타내었다.
2. STZ 투여로 total cholesterol은 감소, HDL-cholesterol은 증가를 나타내었다.
3. STZ 투여로 Glycogen 함량의 유의적인 증가와 G-6-Pase 활성의 유의적인 감소를 나타내었다.
4. G-6-PDH와 GK활성은 증가를 나타내었으나 유의성은 없었다.

이와같이, 연교 에탄올 추출물 1,000 mg/kg을 당뇨 흰쥐에게 투여한 결과 혈당 저하, 지질 대사의 개선 효과 및 정상적인 당 대사 활성을 갖는 유효 성분을 함유하고 있음을 알 수 있었으며, 앞으로 이에 대한 성분 분리가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

References

1. V. A, Koivisto, Insulin therapy in type II diabetes. *Diabetes Care* **16**, 29(1993).
2. H.J. Lim, J.G. Lee, S.H. Lee, H.P. Kim, Anti-inflammatory activity of phylligenin, a lignan from the fruits of *Forsythia koreana*, and its cellular mechanism of action. *J. ethnopharmacol.* **118**:113-117(2008).
3. I.Y. Choi, P.D. Moon, H.N. Koo, N.Y. Myung, S.J. Kim, S.H. Lee, G. Han, n, G. Moon, S.H. Hang, Observations of *Forsythia Koreana* methanol extract on mast cell-mediated allergic reactions in experimental models, In vitro cell *Dev. Biol. Anim.* **43**, 215-221(2007).
4. N.Y. Kim., T.H. Kang, E.K. Sang, H.O. Pae, H.T. Chung. Y.C. Kim, Inhibitory effects of butanol fraction of the aqueous extract of *Forsythia Koreana*-like RAW264.7cells, *J. ethnopharmacol.*, **73**, 323-327(2000).
5. H.W. Jung R. Mawesh, J.G. Lee, S.H. Lee, Y.S. Kim, Y.K. Park, Pinoresinol from the fruits *Forsythia Koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia *Neurosci. letters*, **23**, 215-220(2010).
6. S. Kitagawa., S. Nishibe, H. Baba. Studies on the chine crude drug, "*Forsythia fructus*"VIII.on isolation of phnylpropanoid glycosides from fruits of *Forsythia Koreana* and their antibacterial activity *yakugaku zasshi*, **107**, 274-278(1987).
7. O.K. Kim, Antidiabetic and antioxidative effects of *Lylii fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Oil Chemist's soc.* **25**, 73(2008).
8. N.Y. Kim, H.K. Jung, Effects of fomes fermentarius extract on blood of *pinus densiflora* extract on blood glucose level,

- OGTT and biochemical parameters in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean soc. food sci. nutr.* **34**, 973(2005).
9. W.G. Kim, H.J. Kim, M.S. Chung, Effects of Germanium-forified tricholoma matsutake mycelium and yeast on blood glucose and serum lipid in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Oriental preventive medical society.* **13**, 89(2009).
 10. H.K. Han, S.J. Yoon, G.H. Kim Effects of composite plants on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *J. koreans soc. food sci. nutr.* **38**, 674(2009).
 11. M.D. Meglasson, P.T. Burch, D.K. Berner, H. Najafi, F.M. Matschinsky, Identification of glucokinase as an alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic-cell. *Diabetes* **35**, 1163 (1986).
 12. Y.J. Jo, M.A. Bang Effect of dietary seaweed on blood glucose, lipid and glutathione enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 987(2004).
 13. Z. Liu, E.J. Barrett, A.C. Dalkin, A.D. Zwart and J.Y. Chou, Effect of Acute Diabetes on the Rat Hepatic Glucose-6-phosphatase Activity and its Messenger RNA Level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 680(1994).
 14. S. Himeno, A. Takekawa, and N. Imura, Species Diffence in Hydroperoxide Scavenging Enzymes with Special Reference to Glutathione Peroxidase in Guinea-Pigs. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **104**, 27(1993).
 15. A.V. Alabro, : Liver glukinase(A4564) induces potent hypoglycemia without dyslipidemia through a paradoxical induction of the catalytic subunit of glucose-6-phosphatase *Int. J. Endocrinol.*, 707928 (2011).
 16. V. Vats, S.P. Yadav, and J.K. Grover, Ethanolic Extract of Ocimum Sanctum Leaves Partially Attenuates Streptozotocin-Induced Alterations in Glycogen Content and Carbohydrate Metabolism in Rats, *J. of ethnopharmacology*, **90**, 155(2004).