

Allium hookeri Extract Improves Type 2 Diabetes Mellitus in C57BL/KSJ Db/db Obese Mouse via Regulation of Hepatic Lipogenesis and Glucose Metabolism

Ji-Soo Kim¹, Jin-Sun Heo², Jong-Won Choi¹, Gun-Do Kim³ and Kie-Ho Sohn^{1*}

¹Department of Pharmacology, Kyung-sung University, Da-young dong, Busan 48434, Korea

²Pharm-Steril R&D Center, Southeast Medi-Chem Institute, Busan 48287, Korea

³College of Natural Sciences, Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Received March 25, 2015 / Revised September 21, 2015 / Accepted October 6, 2015

Diabetes has been one of major health risks in industrialized countries. *Allium hookeri* is a wild herb distributed in India and Myanmar. The root of the plant has been used as food and medicine in Southeast Asia. We investigated *Allium hookeri* extract improves type 2 diabetes mellitus in C57BL/KSJ db/db obese mouse. C57BL/KSJ db/db obese mouse arise out of Type 2 diabetes and we treated *Allium hookeri* methanol extract 400 mg/kg (AH 400), 800 mg/kg (AH 800), positive control group (thiazolidinedine;TZDs) were administered orally for 8weeks. AH treated group normalized lipid enzyme system (triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol) and serum glucose, HbA1c and plasma insulin level. AH treated group recovered β -cell damage by hyperglycemia and fatty liver disease. AH treated group significantly up regulated expression of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), pyruvate dehydrogenase kinase4 (PDK4), Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP 1) and fork head box O1 (FOX O1) proteins in C57BL/KSJ db/db obese mouse liver. And we found that AH treated group decreased hepatic malondialdehyde formation in C57BL/KSJ db/db obese mouse liver. These results indicate that *Allium hookeri* methanol extract might be a potential anti-diabetic agent and could be useful in the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Key words : *Allium hookeri*, insulin, proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), type 2 diabetes mellitus, TZDs (thiazolidinedine)

서 론

현대인의 운동부족과 고지방과 고 탄수화물 섭취로 인한 식습관에 의해 '비만' 인구가 전 세계적으로 급격하게 증가하는 추세이다. 비만은 에너지 조화에 장애가 생겨 내장지방 축적을 통해 인슐린 저항성, 고혈압, 고지혈증, 지방간 그리고 동맥경화 등의 질병과 관련 있는 대사증후군을 일으킨다[1]. 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 제 2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 대사성 질환을 일으키는 중요한 질병단계로 인슐린 저항성은 지방간염을 포함한 지방간 질환의 발병기전에 가장 중요한 역할을 한다고 이해되고 있다[17].

세계당뇨병연맹(International Diabetes Federation, IDF)의 자료에 의하면 2010년 당뇨병 환자 수는 전 세계 성인인구의 약 6.4%인 약 2억 8천 4백 만명으로 추산되며, 오는 2030년에

는 세계 성인인구의 약 7.7%인 약 4억 3천만 명으로 대폭 증가할 것으로 예상되어[1] 이에 따르는 의료상 문제들이 심각하게 대두되고 있다.

당뇨병은 인슐린 의존성이 있는 제1형 당뇨병과 인슐린 비 의존성 또는 성인 당뇨병이라고도 불리는 제2형 당뇨병으로 구분할 수 있는데, 제2형 당뇨병은 전체 당뇨병의 90% 이상을 차지하고 있으며, 인슐린 저항성과 상대적 인슐린 결핍의 복합적 작용으로 포도당의 대사 장애를 초래하는 만성적인 질병이다[9]. 현재 제2형 당뇨의 치료를 위해 시판중인 약물들은 탄수화물의 소화를 제한하는 식후 혈당조절제로서 α -glucosidase억제제, 인슐린 분비를 촉진하는 sulfonylurea계 약물, 간에서 포도당 생성을 감소시키는 biguanide계 약물, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 효능제로서 인슐린 작용을 증가시키는 thiazolidinedione (TZD)계 약물이 있으나, 이 약물들은 인슐린 작용을 증가시키는 효과가 있는 반면 지방세포분화를 유도하여 지방세포에 따라 체중증가의 부작용이 보고되고 있으며, 심장비대, 부종, 혈액독성, 간 독성 등의 부작용을 나타냈다는 보고가 있다[5, 6]. 기존의 PPAR γ agonist의 단점을 극복하는 방법으로 partial agonist, PPAR γ antagonist, PPAR α , γ dual agonist의 개발이 시도되었으나, 이러한 약물들은 오히려 항당뇨 효과가 상쇄하는 단점이 있다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4887, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : khosohn@ks.ac.kr

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

삼채는 뿌리부추라고도 부르며, 히말라야 해발 1,400 m 이상 초 고랭지에서 자생하며, 미얀마, 인도 등지에서 주로 섭취하고 있는 채소이다. 현지에서는 주밋(jummyit) 이라고도 부르며, 우리나라의 파, 마늘처럼 쉽게 애용하는 채소이다. 단맛, 쓴맛, 매운맛이 난다고 하여 삼채(三菜)라고 부르기도 하며, 인삼 맛이 난다고 해서 삼채(蔘菜)라고 부르기도 한다[2]. 현지에서는 민간처방으로 암 치료 및 다양한 질환에 사용되고 있다. 이러한 삼채를 최근 한국에 들어와 한국산 삼채로 국내 환경에 맞게 재배에 성공하여 그 성분 및 효능에 대한 관심이 집중되고 있다. 양파, 파, 마늘, 부추등과 같은 *Allium* 속의 식물에는 특징적인 성분으로 S-Allyl-L cystein sulfoxide와 같은 특수 아미노산, 휘발성 유황화합물 사포닌과 같은 천연화합물을 함유한다.

삼채에 대한 연구는 인도네시아 자생 삼채의 식품 및 영양학적인 가치에 대해 Wiuaya등[2]에 의해 언급하였으며, 국내 재배된 삼채에 대해서는 배 등[3]에 의해 삼채 에탄올 추출물의 항염증 효과 및 에 관하여 언급하였으며, 이연리[26]는 국내산 삼채 부위별 생리활성을 비교하였다. 또한 김남석 등[18]은 국내산 삼채의 잎 및 뿌리를 지방실험식이에 처리하여 2형 당뇨의 효과를 말토텍스트린과 비교한 연구가 진행되었다.

본 연구에서는 앞의 연구결과를 토대로 우리나라에서 재배한 삼채 뿌리 메탄올 추출물을 2형 당뇨 쥐에 8주간 경구 투여하였을 때 췌장에서 β -cell의 형태 관찰 및 간 조직에서 2형 당뇨 관련 단백질의 발현을 확인 함으로서 인슐린 저항성 개선효과를 확인코자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 삼채(*Allium hookeri*)는 2013년 10월 지리산 하동촌 농장(하동, 한국) 으로부터 구매하여 사용하였다. 삼채(*Allium hookeri*)의 뿌리 500 g을 methanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)로 3회 추출한 뒤 여과하고, rotary evaporator로 감압농축 한 결과 약 10.2%의 수율을 얻었으며, 이를 시료로 사용하였다.

실험동물

실험동물은 5주령의 수컷 db/db 마우스(C57BL/KSJ db/db obese mouse)와 Wild type마우스(C57BL/KSJ-m+/m+)을 중앙실험동물(서울, 한국)에서 제공받아 사용하였다.

고형사료와 물을 총 8주간 공급하면서 (주)동남의화학연구원 동물사에서 일정한 조건(온도: 22±1℃, 습도: 55±3%, 명암: 12시간 light/ dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후, 식이를 8주간, 매일 같은 시간, 경구 투여하였다.

Table 1과 같이 각 군당 6마리씩 총 6군으로 나누어 실험하였다. 군 구성은 정상군(Wild type마우스(C57BL/KSJ-m+/m+)), control군(C57BL/KSJ db/db obese mouse)은 생리식염수를 투여하였으며, positive control군은 현재 당뇨 치료제로 사용하고 있는 actoz (성분명:pioglitazone, 동아에스티, 서울, 한국) 0.06 mg/kg로 경구 투여하였다. 시료 투여군은 삼채 메탄올 추출물을 각각 400, 800 mg/kg용량으로 8주간 경구 투여하였다. 본 연구는 (주)동남의화학연구원 동물실험위원회 (Southeast Medi-Chem Institute, Institutional Animal Care and Use Committee)의 방침 및 범규에 따라 진행되었다(윤리 승인번호: IKSE- 14-06).

체중 변화, 식이 효율 측정

체중의 변화는 주 1회, 같은 요일, 같은 시간대에 무게를 측정하여 나타내었다. 식이 섭취량은 공급량에서 잔량을 감하여 계산하였다. 식이효율(Food efficiency ratio, FER) 은 체중 증가량을 같은 기간 내 식이 섭취량을 나누어 환산하였다.

$$FER \text{ (Food efficiency ratio)} = \frac{\text{Body weight gain (g)}}{\text{Food intake (g)}} \times 100$$

식후 2시간 후 혈당 측정

혈당은 실험식이투여 4주차~8주차까지 주 2회, 식후 2시간 후, 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당측정기(Roche Diagnostics Ltd., Basel, Switzerland)로 혈당을 측정하였다.

경구당부하검사(Oral glucose tolerance test, OGTT)

실험식이 투여 3주 후, 12시간 이상 절식시킨 후 꼬리정맥에서 채혈하여 공복 시 혈당을 측정하였다. 이후 glucose (1 mg/kg, B.W.) 용액을 경구투여기로 투여하고 30, 60, 90, 120 및 150분에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당측정계(Roche Diagnostics Ltd., Basel, Switzerland)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

혈청 생화학적 검사

실험식이 투여 8주 후 최종일에 실험동물을 12시간 이상

Table 1. Experimental design

Group	Dose (mg/kg)	Design	Number
Normal	-	Saline	6
Control	-	type 2 diabetes	6
Positive control	0.06	type 2 diabetes + actoz 0.06mg/kg	6
AH 400	400	type 2 diabetes + <i>Allium hooheri</i> 400 mg/kg	6
AH 800	800	type 2 diabetes + <i>Allium hooheri</i> 800 mg/kg	6

절식시킨 후, CO₂로 마취시켜 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 혈액으로부터 실온에 30분간 응고시킨 후 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 처리하여 혈청을 회수하였으며, 이를 혈청생화학 검사의 분석시료로 사용하였다. 간장 및 췌장은 0.9% 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고, 장기를 적출하여 생리식염수에 세척한 후, 여지로 수분을 제거하고 무게를 측정하였다. Glucose, Total cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 의 경우 혈청 생화학기 (Roche Ltd., Basel, Switzerland)로 분석하였으며, HbA1C의 경우 서울 의과학 연구소에 의뢰하여 값을 얻었다. Insulin의 경우 ultra sensitive mouse insulin ELISA Kit (Crystal Chem Inc., Downers Grove, USA)을 이용하여 plate reader기 (BioRad, Hercules, USA)를 사용하여 측정하였다.

Lipid peroxide 함량의 측정

Ohkawa등의 방법[20]을 변경하여 간장 조직 1 g당 10배량의 0.1M sodium phosphate buffer (pH7.4)를 가한 후, 조직을 마쇄하고 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 pre-incubation 시켰다. 이후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thio-barbituric acid 를 가한 후, 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-BuOH : Pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심 분리하여 생성된 홍색의 n-BuOH : Pyridine층을 취하여, 파장 532nm에서 그 흡광도를 측정하였다. Lipid peroxidase 함량은 간장조직 1 g당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

단백질 정량

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법[15]에 준하여 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)를 표준품으로 하여 측정하였다.

간장 조직 검사

간장을 관류하여 적출한 다음 10% formalin에 넣어 조직을 고정한 후 수세하고 60%에서 100% alcohol로 순차적으로 탈수하여 파라핀에 포매 하고 block을 만들었다. 이것을 rotary microtome을 사용하여 5 µm의 두께로 조직절편을 만들어 hematoxylin-eosin으로 염색 한 후 광학현미경(Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

췌장 면역조직화학 검사 및 베타세포 관찰

적출한 췌장 조직의 주변의 림프절 또는 지방조직들을 깨끗이 제거한 후 Biotin 용액에 고정하고 에탄올을 이용하여 탈수시킨 후, 투명과정을 거쳐 파라핀을 침투시켰다. 준비된 조직을 파라핀에 포매 하여 순차적으로 박절(4 µm)하였다. 각 개체의 조직마다 임의로 슬라이드 선택하여 xylen으로 탈 파라핀한 후 다시 합수 과정을 거쳤다.

단백질 분해효소에 의한 항원성의 부활과 열처리에 의한 항원성의 회복 방법[10]을 이용하여 항원성을 충분히 부활시킨 후, 메탄올에 3% 농도가 되게 과산화수소를 넣은 혼합용액을 만들어 절편에 처리함으로써 내인성 효소활성을 제거하였다. 그 다음 2% goat serum을 30분간 처리하여 Ig G의 비특이적 결합을 차단시켰다.

췌장조직에서 췌도 세포 관찰을 위하여 인슐린항체(DAKO, Glostrup, Denmark)와 4°C에서 하루 밤 반응시킨 후 PBS로 5분씩 3회 수세하고, peroxidase가 결합되어 있는 anti-IgG로 반응시킨 후 다시 수세과정을 거쳐 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색시켰다. Hematoxylin으로 대조 염색을 실시하고 탈수과정을 거친 후 커버 슬라이드를 덮어 봉입하였다. BrdU 염색을 위해서는 RPN 20 Cell Proliferation Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하였다.

간장 Western blotting

간장의 단백질 분석을 위해 간장조직에 PBS buffer 300 µl를 넣은 후 homogenizer를 이용하여 조직을 파쇄한 후 800 rpm, 10초 centrifuge하여 상층액을 얻었다. 이후, 5,000 rpm, 3분간 centrifuge하여 상층액을 제거하고, PBS buffer 300 µl를 넣고, cell을 풀어준 후 다시 5,000 rpm, 3분간 centrifuge한 후 상층액을 제거한다. Cell lysis buffer 50 µl를 넣고 30분간 ice incubation 한 뒤 14,000 rpm, 4°C, 20 min centrifuge한다.

Bradford assay [19]를 이용하여 단백질을 정량 한 후, 단백질의 SDS-PAGE (Polyacryl Amide Gel Electrophoresis, Biorad, hercules, USA)를 이용하여 size 별로 분리하였다. Semi-dry transfer system (Biorad, hercules, USA)을 이용하여 NC (nitro cellulose) membrane에 이동시킨 후 5% skim milk를 함유한 Blocking buffer (0.5% skim milk, 1× PBST buffer)를 1시간 동안 처리하였다. 1× PBST buffer로 10 min, 3회 washing 후, Primary antibody인 Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBP-1, 1:3,000, Cell signaling technology, Inc., Danvers, USA), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ, 1:2,000, Cell signaling technology, Inc., Danvers, USA), Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4 (PDK4, 1:3,000, Cell signaling technology, Inc., Danvers, USA), Forkhead box protein O1 (FOXO 1, 1:3,000, Cell signaling technology, Inc., Danvers, USA)를 처리한 후 4°C overnight 반응시켜. 1× PBST buffer로 10 min, 3회 washing 하였다. Western Blot detection kit (Biorad, hercules, USA)을 이용하여 membrane과 반응시킨 후 X-Ray film에 감광시켜 발현 정도를 관찰하였으며, GAPDH로 보정하여 비교하였다.

통계 분석

통계적 검정은 SPSS통계 프로그램을 이용하여 수행하였으

며, $p < 0.05$ 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다. 각 항목에 대한 유의한 차이를 나타내는지의 비교분석은 Student's t-test one-way ANOVA (Duncan's multiple range test)를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

체중 증가량, 식이 섭취량, 식이 효율

체중 증가율, 식이섭취량, 식이효율 및 물 섭취량은 Table 2과 같았다.

실험기간 동안 정상군에 비하여 2형 당뇨병인 Control군의 경우 체중증가가 0.298 ± 0.086 g으로 가장 체중증가가 컸으나, 삼채 추출물을 투여한 AH 400, AH 800투여군에서는 체중 증가량이 0.245 ± 0.099 g, 0.278 ± 0.112 g으로 actoz를 투여한 positive control 군의 체중증가와 유사한 범위였다.

식이 섭취량은 2형 당뇨병인 Control군에서 9.610 ± 1.98 g/day였으나, 삼채 추출물을 투여한 AH 400, AH 800투여군에서는 각각 8.738 ± 0.053 g/day, 9.056 ± 0.061 g/day로, 2형 당뇨병인 Control군에 비해 약 1.5배 감소한 것을 확인할 수 있었다. 물 섭취량 또한, 2형 당뇨병인 Control군의 경우 28.014 ± 5.470 g/day였으나, 삼채 추출물 투여로 각각 18.936 ± 3.298 ml/day, 20.147 ± 3.787 ml/day로 감소한 것을 확인할 수 있었다.

이는 2형 당뇨병에 의해 다음, 다식 증상을 나타낸 Control군이 삼채 추출물 투여로 인하여 체중증가 및 식이, 물 섭취량이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

삼채 투여에 따른 OGTT 변화

2형 당뇨의 내당능에 미치는 영향을 검토하기 위해, 시료 투여 3주째 포도당 (1 g/kg body weight) 용액을 경구투여 한 후, 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 혈당치를 측정하였다(Fig. 1).

모든 시료 투여군에서 포도당 투여 후 30분~60분 사이 가장 높은 혈당치를 보였으며, 포도당 투여 30분 뒤 정상군의 혈당은 149.33 ± 4.16 mg/dl이었으며, 2형 당뇨병인 Control군의 혈당은 559.67 ± 18.45 mg/dl로 혈당이 현저히 차이 나는 것을 확인

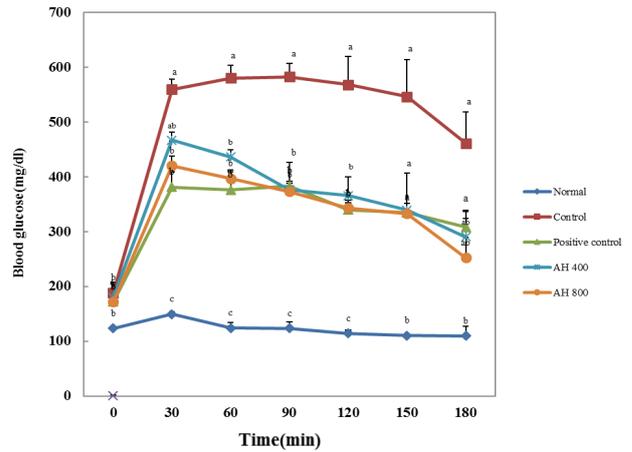


Fig. 1. Effect of *Allium hookeri* methanol extract on the blood glucose OGTT in type 2 diabetic of db/db mouse. Values are mean±S.D, n=6. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

할 수 있었다.

이에 반해 삼채 추출물 투여군인 AH 400, AH 800투여군의 경우 각각, 466.67 ± 15.22 mg/dl, 420.33 ± 17.73 mg/dl로 Control군의 혈당에 비해 약 100~130 mg/dl 혈당이 낮았다. 또한 포도당을 투여한 시간이 지남에 따라, actoz투여한 positive control군과 삼채 추출물 투여군의 감소 경향이 유사한 것을 확인할 수 있었다.

식후 2시간 혈당 변화

삼채 추출물의 식이투여를 한 후, 4주차~8주차의 식후 2시간 혈당치의 변화를 Table 3에 나타내었다. 식후 2시간의 혈당치를 매주 측정된 결과, Normal군의 혈당치의 변화는 156.00 ± 3.61 mg/dl에서 165.23 ± 22.02 mg/dl으로 매주 정상혈당 범위를 유지한 반면, 2형 당뇨병인 Control군에의 혈당치 변화는 413.33 ± 57.30 mg/dl에서 570.33 ± 65.58 mg/dl으로 혈당치가 약 157 mg/dl 증가하는 것을 확인하였다.

이에 반해, 삼채 추출물을 투여한 AH 400, AH 800군의 경

Table 2. Effect of *Allium hookeri* methanol extract on the body weight gains, food intakes, food efficiency ratio and water consumption in type 2 diabetic of db/db mouse

Group	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio	Water consumption (ml/day)
Normal	0.092 ± 0.007^c	3.298 ± 0.023^{cb}	0.027	9.053 ± 1.657^c
Control	0.298 ± 0.086^a	9.610 ± 0.198^a	0.031	28.014 ± 5.470^a
Positive control	0.216 ± 0.182^b	9.100 ± 0.072^b	0.023	23.792 ± 4.336^b
AH 400	0.245 ± 0.099^b	8.738 ± 0.053^b	0.028	18.936 ± 3.298^{bc}
AH 800	0.278 ± 0.112^b	9.056 ± 0.061^b	0.031	20.147 ± 3.787^a

Values are mean±S.D, n=6.

Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

* Food efficiency ratio= Weight gain / Food intake

Table 3. Effect of *Allium hookeri* methanol extract on the level of blood glucose of type 2 diabetic mouse

Group	Blood glucose (mg/dl)				
	0 week	2 week	4 week	6 week	8 week
Normal	156.00±3.61 ^b	158.33±4.18 ^b	163.67±17.24 ^c	164.33±27.06 ^c	165.23±22.02 ^c
Control	413.33±57.30 ^a	490.57±95.51 ^a	550.00±45.21 ^a	570.67±50.91 ^a	570.33±65.58 ^a
Positive control	313.33±51.74 ^a	336.33±71.80 ^a	359.67±9.14 ^b	387.00±26.27 ^b	415.00±14.51 ^b
AH 400	340.67±10.19 ^a	377.00±42.45 ^a	424.00±31.24 ^{ab}	414.33±7.32 ^{ab}	434.00±15.43 ^{ab}
AH 800	323.67±26.16 ^a	355.67±11.26 ^a	404.33±12.52 ^{ab}	415.33±7.32 ^{ab}	430.67±17.62 ^{ab}

Values are mean±S.D, n=6.

Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan’s multiple range test ($p<0.05$).

우 2형 당뇨병인 Control군에 비해 혈당치가 각각 340.67±10.19 mg/dl에서 434.00±15.43 mg/dl, 323.67±26.16 mg/dl에서 430.67±17.62 mg/dl로 혈당치가 조절됨을 확인할 수 있었다.

이는 TZD계 약물인 actoz를 투여한 Positive control군의 혈당치인 313.33±51.74 mg/dl에서 415.00±14.51 mg/dl와 유사한 수준인 것으로 확인되었다.

혈당, HbA1c, Insulin농도의 변화

Fig. 2는 8주 동안 시료 경구투여 한 후, 해부일 공복 시 혈당변화, HbA1c 농도 및 인슐린 농도를 살펴본 결과이다.

Glucose농도는(A) 식후 2시간 혈당변화와 유사하게 2형 당뇨병인 Control군에서 1044.38±51.03 mg/dl로 serum glucose농도가 가장 높았다. 그러나 삼체 추출물 8주 경구투여로 인하여 AH 400, 800군 모두 glucose농도가 각각 822.50±23.33 mg/dl, 892.94±24.23 mg/dl로 Control군에 비해 혈당이 감소한 것을 확인할 수 있으며, 이는 positive control 및 Normal군과 유사한 값이었다.

HbA1c는 2~3개의 혈색소 단백질의 아미노기(valine)과 유리 포도당이 결합된 형태로, 과거 2~3개월 동안 당뇨 조절상태를 반영하며 전반적인 당뇨병 관리 지표로 활용된다[12]. 본

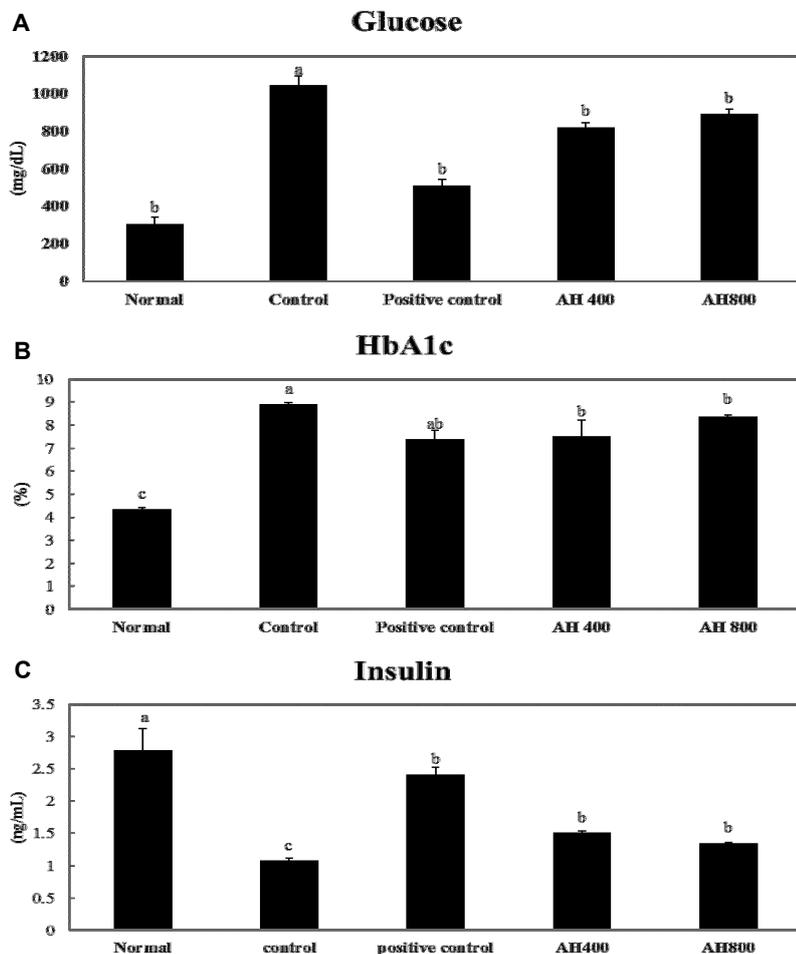


Fig. 2. Effect of serum glucose, HbA1c and insulin level in the normal and diabetic mouse fed *Allium hookeri* methanol extract for 8weeks (A, B, C). Values are mean±S.D, n=6. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan’s multiple range test ($p<0.05$).

실험에서 HbA1c 수치는(B), 2형 당뇨병군(Control)에서 8.92±0.05% 였으나, 삼채 추출물 섭취로 인하여 AH 400, AH 800의 수치가 각각 7.52±0.71%, 8.39±0.05% 로 HbA1c농도가 낮아짐을 확인하였다. 이는 Positive control군의 7.39±0.40%로 수준으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

Insulin농도의 경우(C). 2형 당뇨병인 Control군에서 insulin 농도가 1.08±0.04 ng/ml로 가장 낮은 농도였으며, actoz를 투여한 Positive control군의 insulin 농도는 2.42±0.10 ng/ml로 나타나 actoz가 PPAR-γ를 자극하여 insulin 분비증가에 도움이 된다는[22] 결과와 일치하였다. 한편 삼채 추출물을 8주간 경구 투여한 결과, AH 400, AH 800군에서 각각 1.51±0.03 ng/ml, 1.36±0.01 ng/ml 으로 insulin의 수치가 상승하였으며, 이는 positive control군과 경향이 유사하였다.

결과를 종합해 볼 때, 삼채 추출물 400, 800 mg/kg의 8주 경구 투여에 의해 혈당수치, 당화혈색소 및 insulin 수치에 긍정적인 역할을 하는 것으로 사료된다.

혈중 지질 농도에 대한 효과

Table 3은 삼채추출물 및 actoz약물을 8주간 경구 투여한 후, 혈액 내에 존재하는 지질의 농도를 측정된 결과이다. 2형 당뇨 Control군에서 혈중 triglyceride 농도는 840.30±15.21 mg/dl로 정상군의 58.85±2.24 mg/dl에 비하여 월등하게 높게 나타났으나, 삼채 추출물 400mg/kg, 800mg/kg 투여로 인하여 각각 482.86±13.40 mg/dl, 593.66±21.11 mg/dl의 농도로 감소효과를 확인할 수 있었다. Total cholesterol 및 LDL-cholesterol 농도 또한, 2형 당뇨병인 Control 군에서 각각 289.10±

21.22 mg/dl, 270.69±3.14 mg/dl이었으나, 삼채 추출물 및 actoz약물의 8주 투여로 혈중 지질관련 인자 농도가 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

특히 삼채 추출물 투여군인 AH 400군의 경우triglyceride, total cholesterol 및 LDL-cholesterol 농도가 각각 482.86±13.40 mg/dl, 163.56±13.24 mg/dl, 142.04± 3.24 mg/dl로 2형 당뇨병인 Control 군에 비해 약 50% 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이 수치는 positive control로 투여한 actoz에 비해서 약 15% 농도가 감소한 것을 확인하였다. 이는 2형 당뇨에 의해 증가된 혈중 TG, TC, LDL-cholesterol가 삼채 추출물 8주 경구 투여로 인하여 약 50% 억제되는 경향을 확인할 수 있었다.

간장 지질 과산화 함량에 미치는 영향

지질과산화는 생체에서 자연적으로 발생될 수 있는 superoxide amino radical로부터 유래하는 각종 free radical에 의해 세포막의 다가 불포화지방산이 과산화 되는 현상을 지칭한다. 불포화지방산은 과산화 과정을 통해 분해되어 MDA를 생성하므로 이를 지질과산화를 측정하는 지표로 삼는다[5].

Fig. 3은 간장 조직의 지질 과산화의 함량 변동을 관찰한 결과이다. 2형 당뇨병인 Control군에서 467.74±1.12 MDA nmole/g of tissue로 지질과산화 함량이 나타났으나, 삼채 추출물 투여군인AH 400, AH 800에서 각각319.61±26.98 MDA nmole/g of tissue, 343.99±263.98 MDA nmole/g of tissue로 이는 Positive control 324.38±2.25 MDA nmole/g of tissue와 유사한 값을 확인할 수 있었다.

Table 4. Effect of *Allium hookeri* methanol extract triglyceride, total cholesterol, HDL- and LDL- cholesterol on the serum in db/db mouse for 8 weeks

Group	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
	(mg/dl)			
Normal	58.87±2.24 ^b	79.99±13.22 ^c	28.45±1.21 ^a	61.54±2.11 ^c
Control	840.30±15.21 ^a	289.10±21.22 ^a	18.41±2.11 ^c	270.69±3.14 ^a
Positive control	690.47±16.22 ^{ab}	181.00±24.20 ^b	20.68±2.12 ^b	152.32±2.15 ^b
AH 400	482.86±13.40 ^{ab}	163.56±13.24 ^b	21.52±1.34 ^b	142.04±3.24 ^b
AH 800	593.66±21.11 ^{ab}	209.42±22.21 ^b	21.40±2.13 ^b	188.02±2.35 ^b

Values are mean±S.D, n=6.

Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test (p<0.05).

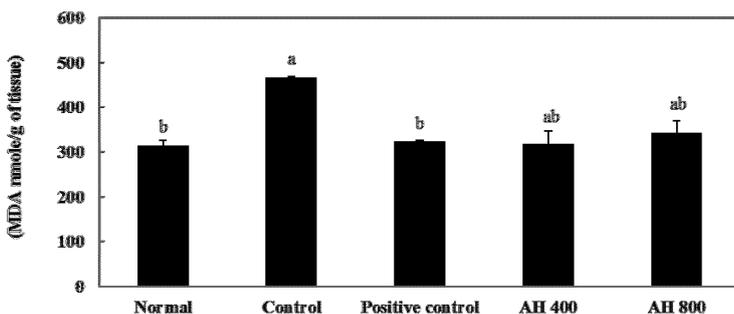


Fig. 3. Effect of *Allium hookeri* methanol extract lipid peroxidase in liver on db/db mouse for 8 weeks. Values are mean±S.D, n=6. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test (p<0.05).

간장 조직 관찰

삼채 추출물 및 시료를 투여한 간장조직을 H&E염색한 결과는 Fig. 4와 같다. Normal군에 비하여 2형 당뇨병인 Control군의 간 조직에서 많은 지방적이 나타나 지방간이 확인되었으나 Positive control 및 삼채 추출물 투여에 의해 지방적의 크기와 수가 많이 줄어드는 결과를 얻었다.

이는 강등[11]의 보고에서와 같이 TZDS를 투여한 2형 당뇨병 OLEFT 군은 대조군 OLEFT 쥐에 비해 조직학적 검사상 지방간의 소견이 현저히 호전되었으며, 앞서 혈중 지질관련 인자의 농도가 유의하게 감소한 결과와도 일치하였다. 특히 삼채 추출물을 8주간 경구투여함으로 2형 당뇨병으로 인해 지방조직이 많은 간 조직이 점차 개선되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 TZDS 계열의 actoz를 투여한 positive control군과 유사한 경

향을 보였다.

췌장 면역화학염색 결과

삼채 추출물 및 시료를 투여한 췌장면역화학염색 결과는 Fig. 5와 같았다. Normal군의 경우 췌도 세포는 둥글거나 타원형이었으며, 인슐린이 염색된 베타세포는 중심부에 균등하게 분포하였으나, 2형 당뇨병인 Control군은 췌도 세포가 거의 손상되어 미세한 공포형성과 베타세포가 고르지 않게 분포하는 것을 확인하였다.

이와는 대조적으로 삼채 추출물을 투여한 AH 400 군의 경우, 정상군과 유사한 형태의 췌도 세포가 확인되었으며, AH 800군은 actoz를 투여한 Positive control군과 유사하게 췌도 세포의 형태가 과 형성을 보였다.

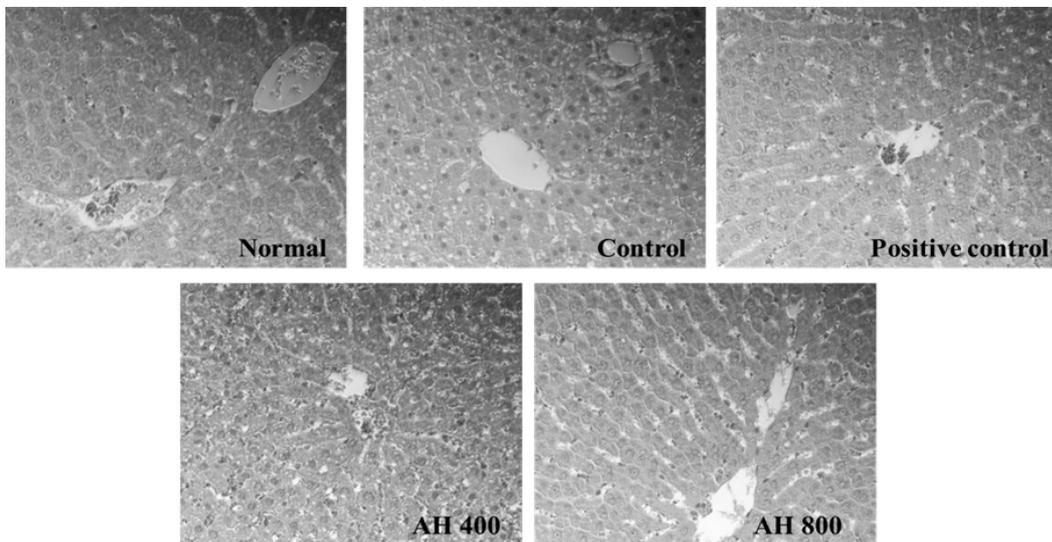


Fig. 4. Histological appearances of the liver tissue in type 2 diabetic of db/db mouse (Hematoxylin and eosin, ×200).

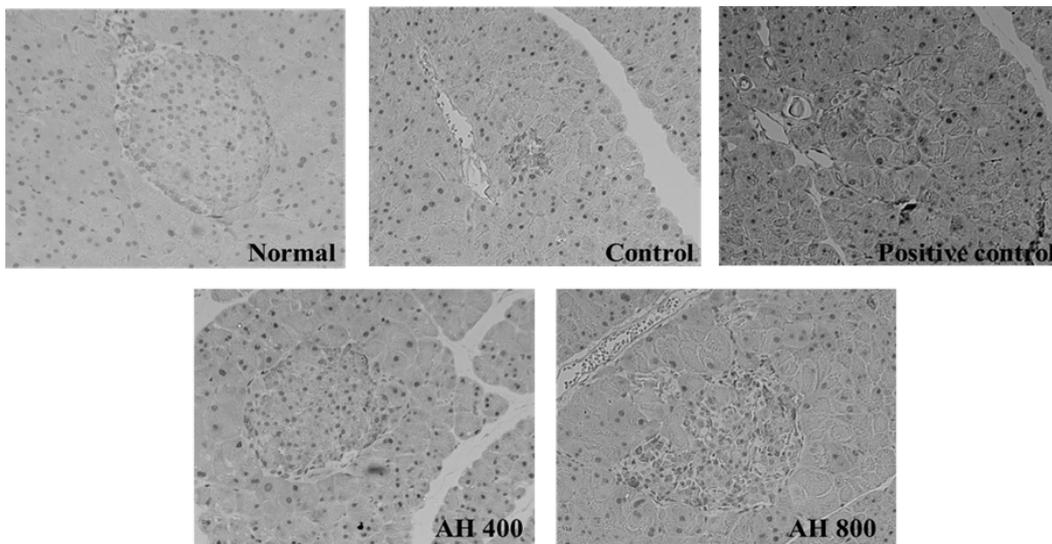


Fig. 5. Immunological appearances of the pancreatic tissue in type 2 diabetic of db/db mouse (×200).

삼채 추출물이 간장에서 SREBP-1과 PPAR γ 발현에 미치는 영향

비만이나 과도한 탄수화물의 섭취로 증가된 유리지방산은 간장 조직에서 인슐린 작용에 직접 연관되는 인슐린 수용체 기질-1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)의 인산화를 방해하여 인슐린 수용체 기질의 불활성화를 유도하고, 증가된 지방산은 근육이나 지방에서 일어나는 포도당 수송체(glucose transporter protein, GLUT4)의 세포 표면으로의 이동을 억제하여 인슐린 저항성을 증가시키고, 간에서 미토콘드리아의 베타산화를 억제하여 간 내 지방 침착을 유발하여 인슐린 저항성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다[23, 24].

인슐린 저항성이 발생하면 혈당이 상승하고 인슐린 농도가 증가하게 되며, 인슐린에 의해 sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) 등 전반적인 지방산의 생합성에 연관된 유전자 발현을 증가시킨다[24]. PPAR γ 는 지방세포에 주로 존재하는 isoform으로, PPAR γ 의 발현은 식후에 가장 높고 이것의 활성화는 지방산의 흡수(uptake)와 포착(trapping)을 전달하는 유전자의 활성을 증가 시킨다. 당뇨병 치료제인 TZD계(rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone)는 이의 효능제로 혈당과 지질 항상성을 조절하여 인슐린 작용을 증가시키는 것으로 알려져 있다[27].

지방조직의 분화와 기능에 대한 PPAR γ 의 역할은 비교적 잘 정립되어 있으나, 근육, 간, 췌장 베타세포 등의 조직에서의 역할에 대해서는 낮게 발현되기 때문에 그 기전이 정확히 밝혀져 있지 않다. FOXO 1의 경우 지방 분화를 억제하는 역할을 하지만 지방의 양이 증가하는 경우 계속적으로 증가가 일어나며, 이 또한 인슐린 내성 당뇨병을 유발시키는 원인으로 작용하게 된다.

Fig. 6은 간 조직의 PPAR γ (A), PDK4 (B), SREBP-1 (C), Forkhead box protein O1 (FOXO 1) (D)의 발현을 확인한 결과이다.

강 등[11]의 보고에서와 같이, 간 조직내 PPAR γ (A), PDK4 (B), SREBP-1 (C), Forkhead box protein O1 (FOXO 1) (D)의 단백질 발현은 2형 당뇨병 Control군에서 모두 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, Positive control인 actoz 투여로 발현이 상대적으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

한편 삼채 추출물 투여군인 AH 400, AH 800군 처리로 인하여 PPAR γ (A), PDK4 (B)의 경우, 단백질 발현이 Positive control인 actoz 투여군 보다 발현 정도가 조금 더 높았으나, 2형 당뇨병 Control군에 비해 적게 발현됨을 확인할 수 있었다.

SREBP-1 (C), Forkhead box protein O1 (FOXO 1) (D)의 경우, 삼채 추출물 400, 800 mg/kg투여로 인하여 positive

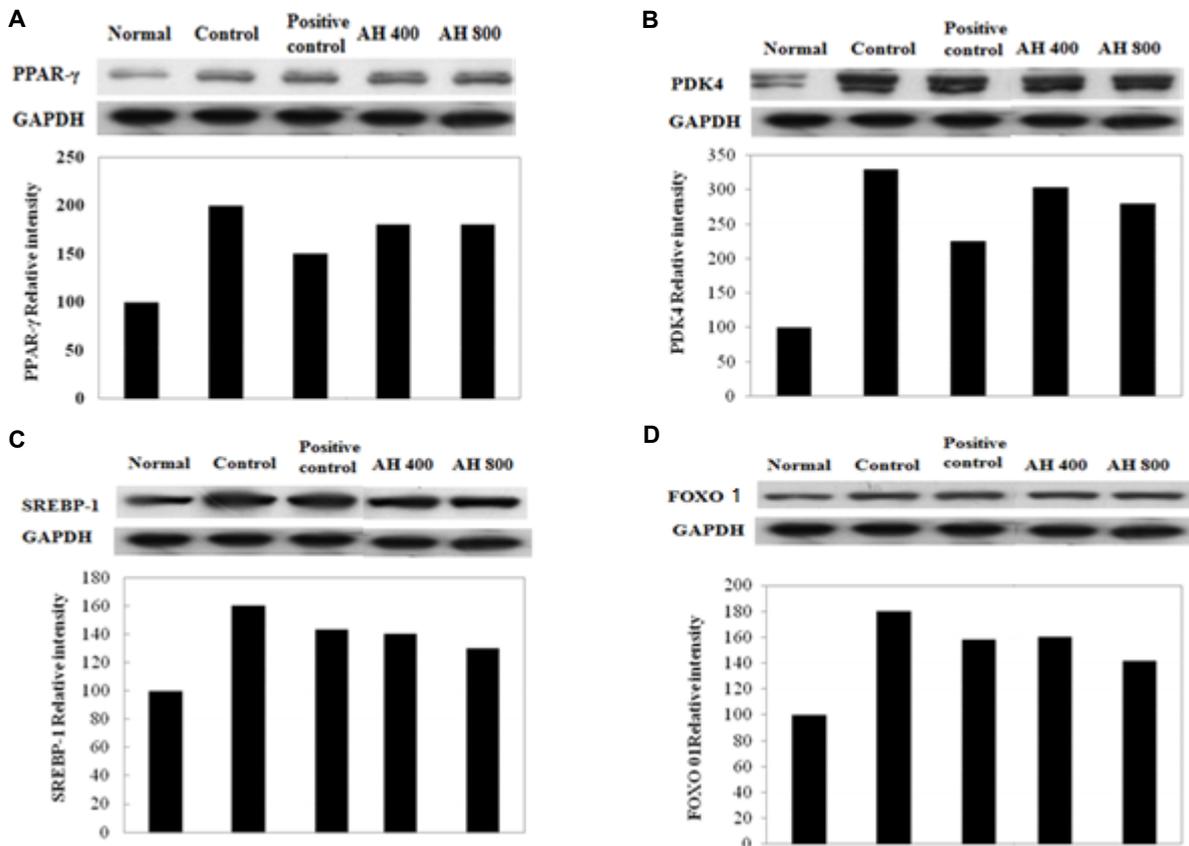


Fig. 6. Western blot analysis of activated PPAR γ , PDK4, SREBP-1, FOXO 1 in the liver of type 2 diabetic of db/db mouse (A, B, C, D).

control인 actoz 투여군과 유사하거나 발현 정도가 더 낮은 경향을 확인하였다. 결과를 종합하여 볼 때, 삼채 메탄올 추출물 8주간의 경구투여로 2형 당뇨 쥐의 간 조직 내 PPAR γ , PDK4, SREBP-1, Forkhead box protein O1 (FOXO 1) 단백질 발현을 저해함으로써 지방 및 인슐린 저항성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

References

- Alberti, K. G. and Zimmet, P. Z. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539-553.
- Ayam, V. S. 2011. *Allium hookeri*, Thw. Enum. A Lesser known terrestrial perennial herb used as food and its ethnobotanical relevance in Manipur. *AJFAND* **11**, 5389-5412.
- Bae, G. C. and Bae, D. Y. 2012. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium Hookeri* cultivated in South Korea. *Kor. J. Herbology* **27**, 55-61.
- Berger, J. and Moller, D. E. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Ann. Rev. Med.* **53**, 409-435.
- Browning, J. D. and Horton, J. D. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* **114**, 147-152.
- Chawia, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. and Lazar, M. A. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800.
- Delarue, J. and Magnan, C. 2007. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **10**, 142-148.
- Gandhi, G. R., Jothi, G., Antony, P.J., Balakrishna, K., Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S., Stalin, A. and Al-Dhabi, N. A. 2014. Gallic acid attenuates high-fat diet fed streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR γ in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **15**, 201-216.
- Garcia, M. J., Mcnamara, P. M., Gordon, T. and Kannel, W. B. 1974. Morbidity in mortality in diabetes in the framingham population. *Diabetes* **23**, 105-108.
- Jung, H. S., Ahn, Y. R., Oh, S. H., Jung, J. H., Kim, T. H., Hwang, Y. C., Kang, M., Bae, Y. S., Kim, Y. S., Chung, J. H., Min, Y. K., Lee, M. S., Lee, M. K. and Kim, K. W. 2007. Effects of islet transplantation on endogenous β -cell regeneration after partial pancreatectomy in rodents. *J. Kor. Diabetes Assoc.* **31**, 113-122.
- Kang, J. G. and Park, C. Y. 2011. The actions of PPAR γ agonists on the various target organs. *Kor. J. Obes.* **20**, 161-169.
- Kannel, W. B. and McGee, D. L. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. *JAHA* **241**, 2053-2038.
- Larsen, T. M., Toubro, S. and Astup, A. 2003. PPAR gamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **27**, 147-161.
- Lehrke, M. and Lazar, M. A. 2005. The many faces of PPAR gamma. *Cell* **123**, 993-999.
- Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mayerson, A. B., Hundal, R. S., Dufour, S., Lebon, V., Befroy, D. and Cline, G., et al. 2002. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, hepatic and skeletal muscle triglyceride, content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 791-802.
- Nakamura, M., Kohjima, M., Morizono, S., Kotoh, K., Yoshimoto, T. and Miyagi, I., et al. 2005. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 631-635.
- Nam, S. K., Choi, B. K., Lee, S. H., Jang, H. H., Kim, J. B., Kim, H. R., Kim, D. K., Kim, Y. S., Yang, J. H., Kim, H. J. and Lee, S. H. 2015. Effects of *Allium Hookeri* on glucose metabolism in type II diabetic mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**, 78-83.
- Nicholas, J. B. and Kruger, N. J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* **32**, 9-15.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- Reitman, S. and Frankel, S. A. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56-63.
- Rocchi, S., Picard, E., Vamecq, J., Gelman, L., Potier, N. and Zeyer, D. 2001. A unique PPAR- γ ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol. Cell* **8**, 737-747.
- Shigekazu, T., Minamiyama, Y., Kodai, S., Shinkawa, H., Takuma, T., Okada, S., Azuma, H. and Kubo, S. 2013. S-Allyl cysteine improves nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats via regulation of hepatic lipogenesis and glucose metabolism. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **53**, 94-101.
- Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 846-854.
- Shin, E. J., Choi, H. B., Han, E. J. and Chung, S. H. 2007. Oryung-san ameliorates pioglitazone side effects. *Yakhak Hoeji* **51**, 307-312.
- Youn, R. L. Physiological activities of ethanol extracts from different parts of *Allium hookeri*. 2015. *Kor. J. Food. Nutr.* **28**, 295-301.
- Yu, J. G., Javorschi, S., Hevener, A. L., Kruszynska, Y. T., Norman, R. A., Sinha, M. and Olefsky, J. M. 2002. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **51**, 2968-2974.

초록 : 삼채 추출물의 인슐린 저항성 개선 효과 및 기전 탐색

김지수¹ · 허진선² · 최종원¹ · 김군도³ · 손기호^{1*}

(¹경성대학교 약학과, ²(주)동남의화학연구원, ³부경대학교 미생물학과)

본 연구는 우리나라에서 재배한 삼채 추출물의 주요생리활성 물질을 2형 당뇨 쥐에 투여하였을 때 인슐린 저항성 개선효과와 췌장에서 β -cell의 형태 및 간 조직의 2형 당뇨 관련 단백질의 발현을 확인 함으로써 그 메커니즘을 확인코자 하였다. 특히 TZDS당뇨약 계열로 현재 시판중인 actoz와 활성을 비교 함으로써 그 유효성 정도를 살펴 보고자 본 실험을 디자인하였다. 먼저 식이섭취량, 물 섭취량의 경우, Control군은 2형 당뇨 특징인 다식, 다뇨, 다갈의 형태로 증가하였으나, 삼채 추출물 투여로 식이 및 물 섭취량이 감소하는 경향을 보였다. 식이 투여 2시간 후 혈당변화와 OGTT 검사결과, 2형 당뇨인 Control군에서 혈당의 농도가 가장 높았으나 삼채 추출물 8주 경구 투여로 인해 안정화되는 것을 확인할 수 있었으며, serum의 glucose농도 또한 삼채 추출물 투여로 2형당뇨 control군에 비해 혈당이 감소한 것을 확인할 수 있었다. HbA1c (당화혈색소)는 2형 당뇨군(control)에서 9% 수치 범위로 고혈당 범위였으나, 삼채 추출물 섭취로 인하여 Positive control군(actoz 투여군) 7% 수준으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며, insulin농도는 2형 당뇨인 Control군에서 insulin 농도가 1 ng/ml로 가장 낮은 농도였으며, 삼채 추출물 및 SAC 1.5 ng/ml수준으로 insulin수치가 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 혈중 triglyceride, total cholesterol 및 LDL-cholesterol 수치 모두 시료 투여군에서 혈중 지질관련 인자의 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 AH 400군의 경우 triglyceride, total cholesterol 및 LDL-cholesterol 농도가 각각 482.86 ± 13.40 mg/dl, 163.56 ± 13.24 mg/dl, 142.04 ± 3.24 mg/dl로 대조군에 비해 약 50% 감소한 결과를 나타내었다. 간장 조직 중 지질 과산화의 함량의 경우, 2형 당뇨인 Control군에서 467.74 ± 1.12 MDA nmole/g of tissue로 삼채 추출물 투여(AH 400)로 319.61 ± 26.98 MDA nmole/g of tissue 로 Normal군과 비슷한 수준으로 혈중 lipid peroxide의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 간장조직을 H&E염색한 결과, Normal군에 비하여 2형 당뇨인 Control군의 간 조직에서 많은 지방적이 나타나 지방간이 확인되었으나, Positive control 및 삼채 추출물 투여에 의해 지방적의 크기와 수가 많이 줄어드는 결과를 얻어 조직학적 검사상 지방간의 소견이 현저히 호전되었으며, 췌장에서 insulin 면역화학 염색 결과 2형 당뇨로 췌도 세포가 거의 손상된 것과는 대조적으로, 삼채 추출물 투여한 결과 정상군과 유사한 형태의 췌도 세포가 확인되었으며 췌도 세포의 형태가 다양한 정도의 과 형성을 보이는 것이 확인되었다. 또한 간장 조직의 PPAR γ , PDK4, SREBP-1, FOXO 1의 발현을 확인한 결과, 발현이 2형 당뇨인 Control군에서 모두 발현이 증가하였으나, 삼채 추출물 투여로 인해 발현 정도가 낮게 나타나 앞서 확인하였던 glucose 및 HbA1c 및 insulin농도의 결과와 상통함을 확인하였다. 이들의 결과로 미루어 볼 때, 삼채 메탄올 추출물의 8주간 경구 투여로 인하여 2형 당뇨에 관여하는 PPAR γ 단백질 및 비만 관련 단백질 인자를 조절하였으며, insulin농도 및 식후 혈당조절에도 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 췌장의 insulin 면역화학염색 결과, 췌도 세포 형태 및 insulin 합성에도 긍정적인 역할을 하는 것으로 미루어 보아 2형 당뇨에 대한 치료효과가 큰 것으로 사료 된다.