

## 가시오갈피 물 추출물이 간세포에서 포도당 이용 대사에 미치는 영향

김대중<sup>1</sup> · 강운환<sup>2</sup> · 김경곤<sup>3</sup> · 김태우<sup>1</sup> · 박재봉<sup>4</sup> · 최 면<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터  
<sup>2</sup>한약진흥재단, <sup>3</sup>강원대학교 생명건강공학과  
<sup>4</sup>한림대학교 의과대학 생화학교실

### Effects of *Acanthopanax senticosus* Water Extract on Glucose-Regulating Mechanisms in HepG2 Cells

Dae-Jung Kim<sup>1</sup>, Yun Hwan Kang<sup>2</sup>, Kyoung Kon Kim<sup>3</sup>, Tae Woo Kim<sup>1</sup>,  
Jae Bong Park<sup>4</sup>, and Myeon Choe<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Well-being Bioproducts RIC and <sup>3</sup>Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University

<sup>2</sup>National Development Institute of Korean Medicine

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Hallym University College of Medicine

**ABSTRACT** This study aimed to investigate glucose uptake mechanisms and metabolic mechanisms for absorbed glucose in HepG2 cells treated with *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW). A colorimetric assay kit was used to measure polyphenol content, glucokinase (GK) activity, glucose uptake, glucose consumption in cell culture medium, and glycogen content. RT-PCR and western blotting were performed to examine changes in the expression levels of glucose transporter 2 (GLUT2), hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k), protein kinase B (Akt), phospho-AMP-activated protein kinase (AMPK), phosphoenolpyruvate carboxykinase, GK, and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Increased glucose uptake upon ASW treatment was confirmed to result from increased expression of HNF-1 $\alpha$ , which is one of the transcription factors acting on the GLUT2 promoter. From the measurements of GK activity, we observed that ASW had an effect on glucose phosphorylation, and we also confirmed that increased AMPK phosphorylation promoted glycolysis and suppressed gluconeogenesis. We confirmed that the increase in glycogen upon ASW treatment was induced by activation of Akt by PI3k, followed by phosphorylation of GSK3 $\beta$ . This study demonstrates that ASW activates glucose metabolic mechanisms in liver cells and is therefore a potential candidate to alleviate diabetes.

**Key words:** *Acanthopanax senticosus*, anti-diabetic, glucose transporter, glucokinase, glycogen

## 서 론

국내외적으로 유병률이 높은 당뇨병(diabetes mellitus)은 만성적인 대사성 질환으로 운동 및 식이요법과 함께 약물요법이 절대적으로 필요한 질환이다(1,2). 당뇨는 만성적인 고혈당이 특징인 질환으로 췌장의  $\beta$ 세포에서 인슐린 분비 부족이나 인슐린 수용체의 이상으로 인한 인슐린 저항성 증가에 의해 유발된다(3). 당뇨병 관리의 최종목표는 이상적인 혈당 수준을 지속해서 유지하고, 당뇨로 인해 발생하는 합병증을 지연시키거나 예방하는 것이다(4). 당뇨병에 의한 합병증으로는 신장 기능장애, 당뇨병성 망막변증, 동맥경화증 등이 있으며 심각한 경우 생명에 위협을 받아 사망에 이르게

된다(5). 당뇨병의 증세를 개선하기 위해 사용되는 약물요법 중 경구용 혈당 강하제는 대부분 합성의약품으로 sulfonylurea, biguanide, voglibose, meglitinide, thiazolidinedione, acarbose가 있으나 장기간 약물 복용으로 인한 부작용이 나타나고 있다(6). 따라서 최근에는 부작용을 줄이고 항당뇨 효능이 있는 천연물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(7). 가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*)는 인삼, 산삼과 함께 오가과에 속하는 낙엽관목으로 인삼과 유사한 점이 많아 시베리아 인삼이라고도 불린다(8). 국내외적으로 가시오갈피는 항면역(9), 항산화(10), 항염증(11), 항암(12) 등 다양한 효능이 알려져 있으며, 이런 다양한 생리활성은 eleutheroside, sesamin, syringin, isofraxidin 및 chlorogenic acid, caffeic acid와 같은 페놀성 기능성 화합물이 연관된 것으로 예측된다(11,13,14). 최근 가시오갈피에 대한 항당뇨 연구로는 제2형 당뇨 동물모델에서 혈당 강하, 인슐린 저항성 개선 및 혈중 당화혈색소 감소 효과(15),  $\alpha$ -glucosidase 활성저해 효과(16), glucose transporter

Received 14 December 2016; Accepted 17 April 2017

Corresponding author: Myeon Choe, Department of Bio-Health Technology, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea  
E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-8645

(GLUT)의 유전자 발현 증가를 통한 혈중 포도당 조절 기능(17), 그리고 지골피(*Lycii cortex*), 동충하초(*Cordyceps militaris*), 가시오갈피 복합추출물을 이용한 고평도당 조건에서 당대사 관련 효소의 활성화(18)를 확인한 것들이 있다. 현재까지 가시오갈피 추출물을 이용한 다양한 생리활성은 보고되었지만 항당뇨 효능에 대한 작용메커니즘 구명에 대한 연구는 미비하다. 최근에는 음식 섭취 후 증가한 혈당을 해결하려는 방법으로 당류생성 억제(19) 및 생성된 당을 세포 내로 빠르게 전달시켜 소비시키는 방법이 연구되고 있다(20-22).

인체 기관 중 간은 섭취한 포도당을 소모하여 에너지로 사용하거나 glycogen으로 전환 저장하는 작용을 주로 하며 공복 시 인체가 필요로 하는 포도당을 공급하는 중요한 역할을 한다(20). 식후 간세포는 GLUT2를 통해 주로 세포 내로 포도당을 수송하고(21), 운반된 포도당은 포도당을 이용하는 대사관련 효소들에 의해 소비된다(22). Glycolysis의 증가는 glucokinase의 활성화에 의해 촉진될 수 있으며 이는 간세포에서 에너지 생성 및 glycogen 전환으로 유도된다고 알려져 있다(23).

HepG2 세포는 Human hepatoma cell line으로 증식률이 빠르고 hepatocyte의 기능을 모두 가지고 있는 세포로 간 기능관련 대사 연구자가 매우 선호하는 세포이다. 최근 HepG2 세포에 다양한 천연물을 처리하여 대사성 증후군에 미치는 연구가 보고되고 있다(24-26).

이에 본 연구에서는 가시오갈피 물 추출물(ASW)을 이용하여 HepG2 세포에서 포도당 수송 및 흡수와 관련된 기전 그리고 glycogen 저장 기전 연구를 통해 혈당감소 기전에 미치는 ASW의 영향을 예측하고 당뇨 예방 소재로서의 이용 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 추출

실험에 이용된 가시오갈피는 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 건조된 시료(30 g)는 정선 후 분쇄기(FM-681C, Hanil Electric., Seoul, Korea)로 완전히 분쇄한 후 10.7배의 증류수를 첨가한 다음 60°C shaking incubator(KMC 8480SF, VISION, Daejeon, Korea)에서 24시간 추출한 후 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 상층액을 syringe filter 0.45 µm로 여과한 후 동결 건조기(BD8512, Ilshin Lab. Co., Ltd., Yangju, Korea)로 건조하여 얻어진 고형분은 재용해하여 다양한 농도로 제조하여 실험에 이용하였으며 ASW로 명명하였다.

### 총폴리페놀 함량 측정

총폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 이용하여 측정하였다. ASW 0.2 mL에 증류수 4.8 mL를 넣은 후 50% Folin-

Ciocalteu's phenol 0.5 mL를 넣어주고 혼합한 다음 3분간 정치한 후 1 mL의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Sigma-Aldrich Co.)를 첨가한다. 혼합액을 1시간 동안 정치한 다음 UV/vis spectrophotometer(Optizen 2120UV plus, Mecasys Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총폴리페놀 함량은 caffeic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 검량선(R<sup>2</sup>=0.995)을 작성한 다음 caffeic acid equivalents(CAE)로 나타내었다.

### Cell culture

HepG2 세포(hepatocellular carcinoma)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. HepG2 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Welgene, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin(PEST, Welgene)이 첨가된 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 90% minimum essential medium(MEM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### Cell cytotoxicity assay

세포독성은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. HepG2 세포를 96-well plates에 1×10<sup>4</sup> cells/mL로 100 µL씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후 FBS와 항생제를 넣지 않은 배지에 ASW를 다양한 농도별로 제조한 다음 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 MTT 시약을 100 µL(5 mg/mL) 넣고, 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 형성된 formazan에 dimethyl sulfoxide 100 µL를 첨가한 후 shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 UV/vis spectrophotometer(Optizen 2120UV plus, Mecasys Co., Ltd.)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(Control)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 관찰하였다.

### Glucose uptake 측정

ASW가 HepG2 세포에서 glucose uptake에 미치는 영향은 glucose uptake colorimetric assay kit(Biovision, Milpitas, CA, USA)을 사용하여 실험하였다. 즉 HepG2 세포를 96-well plates에 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 분주한 다음 24시간 동안 배양한 후 FBS가 없는 배지로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 배양된 세포는 2% BSA+ KRPH(Krebs ringer phosphate HEPES)로 교체하였다. 40분 후 1 µM의 insulin(Gibco, Grand Island, NY, USA)과 ASW(1.0 mg/mL)를 처리하여 20분간 동안 더 배양한 다음 10 mM 2-deoxyglucose를 20분간 처리하였다. 세포에 assay buffer 8 µL와 enzyme mix A 2 µL를 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 extraction buffer를 이용해 세포 추출

물을 회수하였다. 85°C에서 40분간 가열한 후 바로 냉각시키고 neutralization buffer를 첨가하였다. 500 rpm에서 10초간 원심분리 하고 상층액을 취하여 kit에 포함된 glutathione reductase 20 µL, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 16 µL, recycling mix 2 µL를 각각의 well에 첨가하여 40분 동안 반응시킨 후 microplate reader(EL 808, BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Glucokinase(GK) activity assay

GK 활성은 hexokinase colorimetric assay kit(Abcam, Cambridge, MA, USA)을 사용하여 실험하였다. GK 활성에 의해 생성된 glucose-6-phosphate(G6P)가 G6P dehydrogenase(G6PDH)와 반응할 때 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP<sup>+</sup>)가 NADPH로 환원되는 것을 이용하여 GK 활성도를 측정하였다. ASW(1.0 mg/mL)를 다양한 시간별로 배양한 후 회수된 세포에서 단백질을 추출하고 40 µg/50 µL의 단백질을 분주하였다. 전처리 후 각 well당 assay buffer 34 µL, enzyme mix 2 µL, developer 2 µL, coenzyme 2 µL, hexokinase 10 µL를 처리한 다음 microplate reader(EL808, BioTek)를 사용하여 450 nm에서 3분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

#### Total RNA 추출 및 cDNA 합성

6-well plates에 HepG2 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 배양하고 ASW를 1.0 mg/mL 처리한 다음 24시간 배양하였다. 각 well에 ASW가 함유된 배지를 제거한 후 phosphate buffer saline(PBS) 용액으로 2회 washing 하고 QIAzol lysis reagent(Qiagen, Hilden, Germany)를 1 mL씩 분주하여 세포를 lysis 하였다. 새 tube로 옮긴 lysate는 chloroform 200 µL를 분주하여 15초간 혼합하였다. 그 후 12,000×g에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 isopropanol 500 µL가 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000×g 10분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% 에탄올과 0.1% diethyl pyrocarbonate water를 75:25로 섞어 만든 75% 에탄올을 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 12,000×g에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 µL씩 분주하여 녹인 후 total RNA 양을 정량하였다. First strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRiort Platinum cDNA synthesis Master Mix(GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였다. 추출한 RNA(2 µg)와 RNase free water로 9 µL를 맞추고 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2× cDNA synthesis 완충용액 10 µL, cDNA synthesis enzyme mix 1 µL를 섞어 각 PCR tube에 더한 다음 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

#### RT-PCR

GLUT2의 mRNA 발현은 PCR로 확인하였다. 실험에 사용한 GLUT2와 내부표준 유전자인 β-actin의 primer sequence는 GAT GAA CTG CCC ACA ATC TC(forward), CTG ATG AAA AGT GCC AAG TG(reverse), ACA GGA AGT CCC TTG CCA TC(forward), AGG GAG ACC AAA AGC CTT CA(reverse)이다. PCR tube에 Go Tag Green Master(Promega, Madison, WI, USA) 10 µL, forward primer(15 µM)와 reverse primer(15 µM)를 각각 0.5 µL, nuclease free water 8 µL, 합성한 first-stand cDNA 1 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였으며, GLUT2 PCR 조건은 94°C에서 5분(1 cycle), 94°C에서 30초, 59°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초(26 cycle), 72°C에서 5분(1 cycle)이었다. 18S PCR 조건은 94°C에서 5분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초(18 cycle), 72°C에서 5분(1 cycle)이었다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에서 30분간 전기영동 후 UV광으로 확인하였다. 밴드의 강도는 image J(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

#### Western blot analysis

HepG2 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mL로 6-well plates에 분주하여 24시간 동안 배양한 후 ASW 1.0 mg/mL를 처리하여 24시간 동안 더 배양한 다음 lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor cocktail)를 이용하여 4°C에서 용해시켰다. Cell extract를 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4°C) 하여 얻은 단백질량은 Bradford assay법으로 정량하였다. 동일 양의 단백질(30 µg)과 β-mercaptoethanol을 포함한 sample buffer를 1:1로 혼합한 후 100°C에서 3분간 가열하였다. 준비된 단백질 샘플들은 Bio-Rad minigel system을 이용하여 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 후 polyvinylidene fluoride membrane(0.45 µm, PVDF transfer membrane, Thermo, Rockford, IL, USA)으로 단백질을 전이시켰다. Membrane은 0.1% Tween 20과 5% skim milk를 함유한 tris-buffered saline(TBS)에 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 HNF-1α(5,000:1), GLUT2(5,000:1), pAMPK(1,000:1), PEPCK(1,000:1), GK(1,000:1), GAPDH(5,000:1)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), pPI3K(1,000:1), PI3K(1,000:1), pAkt(1,000:1), Akt(1,000:1), pGSK-3β(1,000:1)(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 1차 antibody가 첨가된 buffer에서 1시간 동안 반응한 후 TBS-T(TBS containing 0.1% Tween-20)로 5분간 3차례에 걸쳐 세척하였다. 세척한 membrane은 2차 anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase antibody(Santa Cruz Biotechnology)가 첨가된 buffer에 넣고 상온에서 1시간

동안 반응한 후 TBS-T로 5분 단위로 3차례에 걸쳐 세척하였다. Enhanced chemiluminescence method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시킨 후 그 밴드의 강도는 image J 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

**Glycogen contents 측정**

HepG2 세포에 1 mg/mL 농도로 ASW를 처리하고 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음 200 µL 멸균증류수를 이용하여 저온에서 균질기 및 피펫으로 세포를 균질하였다. 100°C에서 10분간 가열하여 샘플 내 효소들을 실효시킨 뒤 4°C, 18,000×g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 실험에 사용하였다. Bradford assay 방법을 통해 단백질을 정량하고 glycogen assay kit (Abcam, Cambridge, UK)을 이용하여 세포 내 glycogen 함량을 측정하였다. Glycogen standard와 세포 추출액 50 µL를 96-well에 분주하고 hydrolysis buffer 50 µL, hydrolysis enzyme 2 µL를 더하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 reaction mix(development buffer 46 µL, development enzyme mix 2 µL, oxiRed probe 2 µL) 50 µL를 모든 well에 분주하고 빛을 차단하고 실온에서 30분간 반응시킨 다음 microplate reader(EL808, BioTek)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

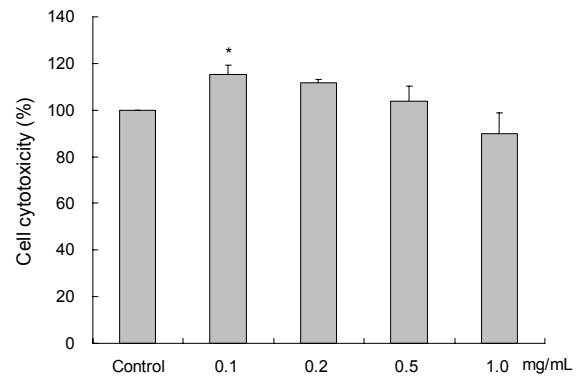
**통계분석**

모든 실험 결과는 3회 이상 반복하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 통계분석에 의한 유의성(P<0.05) 검증은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences) program의 one-way ANOVA test로 집단 비교분석을 하고 독립 실험군 간 유의성은 t-test를 통해 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**물 추출물 수율 및 총폴리페놀 함량**

ASW의 물 추출 수율 및 총폴리페놀 함량은 Table 1과 같았으며, ASW는 3회 반복 추출하여 얻은 평균수율이 약 6.87±0.23%였다. 총폴리페놀 함량은 약 88.62±1.94 CAE mg/g이었다. 과일 엽채류에 다량 함유된 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, lignans, resveratrols 등을 총칭하여 폴리페놀 화합물이라 하며 (27), 인체 내 항산화, 항균, 항암 등 다양한 생리 활성이 보고되고 있다(28,29). 폴리페놀의 함량이 높으면 항산화력이 높다는 상관관계(27)를 바탕으로 ASW 또한 강한 항산화



**Fig. 1.** Concentration-dependent effects of *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW) on HepG2 cell growth. Cell viability was analyzed using MTT assay. Data were expressed as mean values±standard deviation, derived from three independent experiments. The different letters denote significant differences between groups at P<0.05 by one-way ANOVA supplemented with SPSS.

작용을 나타낼 것으로 예측된다.

**세포독성**

MTT assay 방법을 이용하여 HepG2 세포에서 ASW 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/mL의 세포독성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. ASW 처리농도에서 대조군과 비교한 결과 변화가 없거나 증가하였으며, 최고 농도인 1.0 mg/mL에서도 유의한 세포사멸은 관찰되지 않아 세포독성이 없다고 판단하였다. 이러한 결과를 바탕으로 HepG2 세포를 이용한 실험에서 ASW 처리농도는 세포 생존율에 영향을 주지 않은 1.0 mg/mL로 결정하였다.

**ASW가 glucose uptake에 미치는 영향**

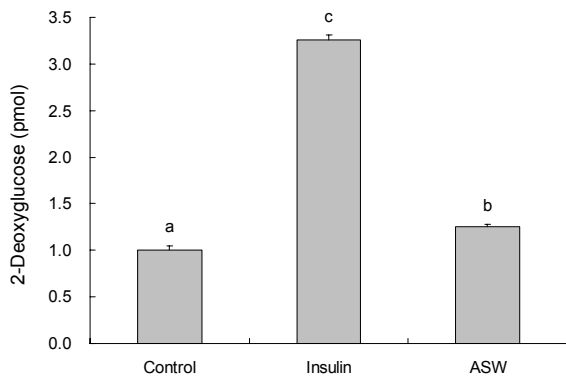
Glucose uptake 측정은 glucose와 구조적으로 유사한 2-deoxyglucose(2-DG)의 세포 내 축적량을 측정하는 원리로 실험 결과는 Fig. 2와 같다. HepG2 세포에 ASW 1.0 mg/mL를 24시간 처리하여 측정된 결과 대조군과 비교하였을 때 약 1.25배 유의적인 glucose uptake 증가를 보였지만 인슐린을 처리한 군(약 3.26배)보다는 낮은 glucose uptake를 나타내었다. 세포 내 glucose uptake 증가 결과로 ASW 처리가 glucose의 세포 내 유입에 유의한 효과가 있는 것을 유추할 수 있었다.

**HepG2 세포 내 포도당 유입 관련 mRNA와 protein 발현**

인간 간의 주요 glucose transporter(GLUT) family 유전자 중 발현 비율이 약 67.4%로 가장 높은 것으로 GLUT2

**Table 1.** Extraction efficiency of *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW) and total polyphenol content

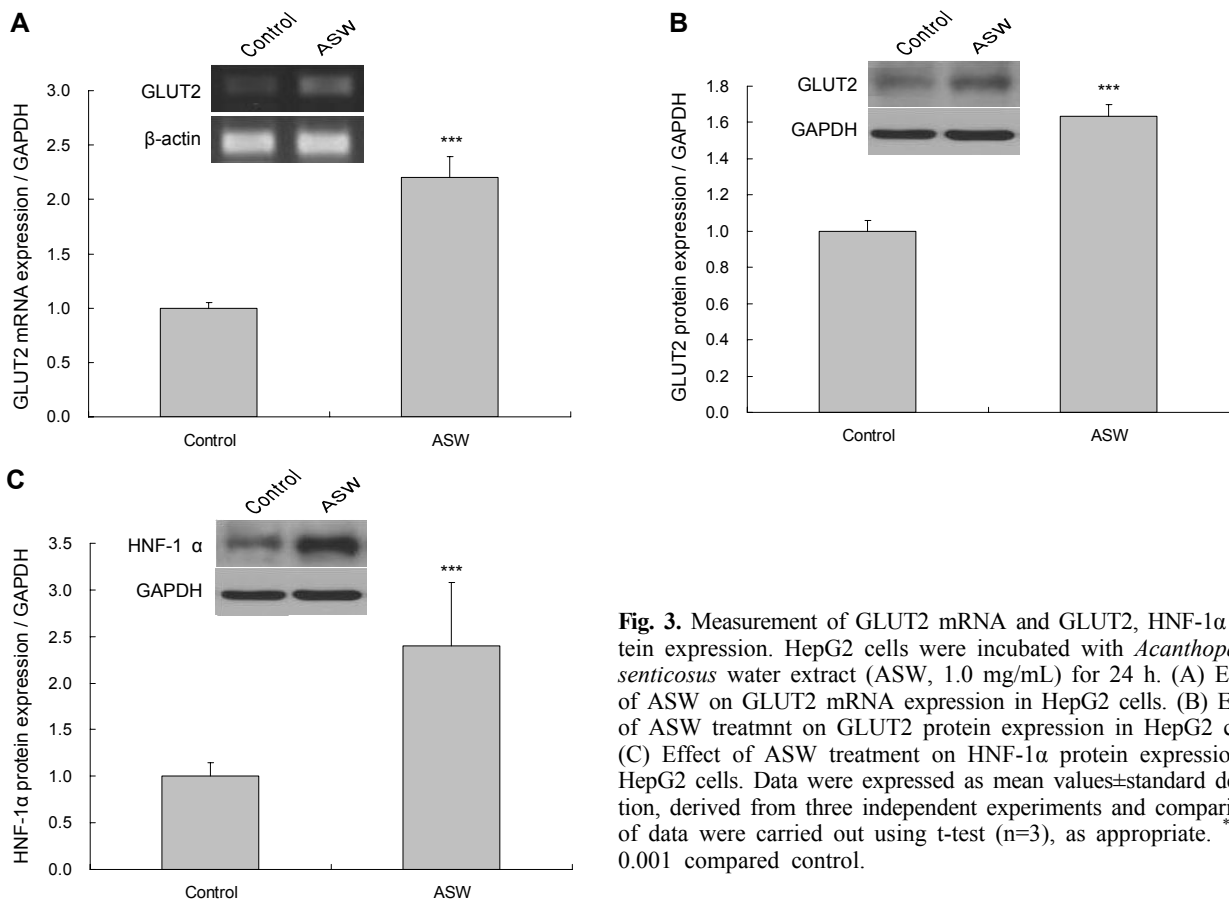
Sample	Extraction efficiency				Total polyphenol (CAE mg/g)
	Sample weight (g)	Moisture content (%)	Extract weight (g)	Yield (%)	
ASW	30.0	9.91±0.19	2.06±0.07	6.87±0.23	88.62±1.94



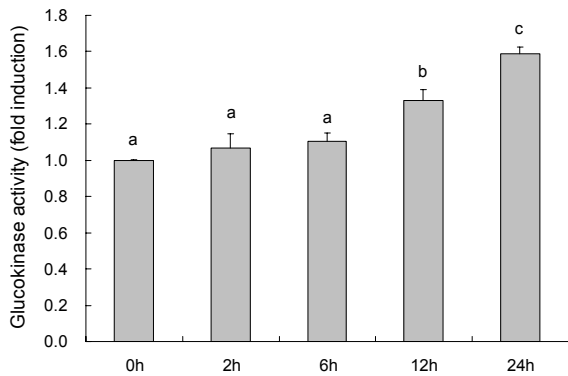
**Fig. 2.** HepG2 cells were incubated for 20 min in a KRPH buffer containing insulin (1  $\mu$ M) and ASW (1 mg/mL). The 2-deoxyglucose assay was performed 20 min later, as detailed in "Methods". Data were expressed as mean values $\pm$ standard deviation, derived from three independent experiments. The different letters denote significant differences between groups at  $P < 0.05$  by one-way ANOVA supplemented with SPSS.

가 알려져 있다(30). GLUT2는 다른 GLUTs와는 다르게 인슐린의 영향을 받지 않고 포도당에 의해 GLUT2의 발현이 유도된다고 보고되고 있다(30). 따라서 ASW가 GLUT2의 발현에 미치는 영향을 검증하기 위해 HepG2 세포에서 GLUT2의 mRNA와 protein 발현 및 이를 조절한다고 알려

진 hepatocyte nuclear factors(HNF-1 $\alpha$ )(31)의 protein 발현을 확인하였다. ASW 1.0 mg/mL를 24시간 처리한 후 GLUT2 mRNA(Fig. 3A)와 protein(Fig. 3B) 발현을 각각 측정된 결과, 무처리군 대비 mRNA 발현은 약 2.2배, protein 양은 약 1.63배로 유의하게 발현이 증가하였다. GLUT2의 transcription factor로 알려진 HNF-1 $\alpha$ 의 protein 발현을 확인한 결과, Fig. 3C와 같이 무처리군 대비 약 2.4배 유의하게 발현이 증가하였다. 이를 통해 ASW 처리가 HepG2 세포에서 GLUT2 mRNA 발현을 증가시켰고 증가한 mRNA가 안정적으로 단백질 합성에 영향을 주었음을 확인하였다. 이는 인슐린 비의존적인 상황에서 ASW가 GLUT2에 의한 배양배지 내 glucose의 HepG2 세포 내로의 유입을 유도할 수 있음을 의미한다. GLUT2의 발현이 ASW 처리에 의해 어떻게 조절되는지 명확히 확인하기 위해 GLUT2의 transcription factor인 HNF-1 $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein beta(C/EBP $\beta$ )와 GLUT2 promotor의 binding assay 및 C/EBP $\beta$ 의 발현 변화에 대한 추가 연구가 진행되어야 하지만, Kang 등(26)이 보고한 청미래덩굴 잎 추출물이 HepG2 세포에서 HNF-1 $\alpha$  발현유도를 통한 GLUT2의 증가로 glucose uptake가 증가하였다는 연구 결과 및 GLUT2 transcription factor의 발현 조절기전에 대한 다수의 연구 결과(32,33)를 통해 HNF-1 $\alpha$ 에 의한 GLUT2 mRNA의 증



**Fig. 3.** Measurement of GLUT2 mRNA and GLUT2, HNF-1 $\alpha$  protein expression. HepG2 cells were incubated with *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW, 1.0 mg/mL) for 24 h. (A) Effect of ASW on GLUT2 mRNA expression in HepG2 cells. (B) Effect of ASW treatment on GLUT2 protein expression in HepG2 cells. (C) Effect of ASW treatment on HNF-1 $\alpha$  protein expression in HepG2 cells. Data were expressed as mean values $\pm$ standard deviation, derived from three independent experiments and comparisons of data were carried out using t-test (n=3), as appropriate. \*\*\* $P < 0.001$  compared control.



**Fig. 4.** Measurement of glucokinase activity of *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW, 1.0 mg/mL) in HepG2 cell. HepG2 cells were incubated with ASW (1.0 mg/mL) for 24 h. Data were expressed as mean values±standard deviation, derived from three independent experiments. The different letters denote significant differences between groups at  $P < 0.05$  by one-way ANOVA supplemented with SPSS.

가는 예측 가능한 것으로 판단된다.

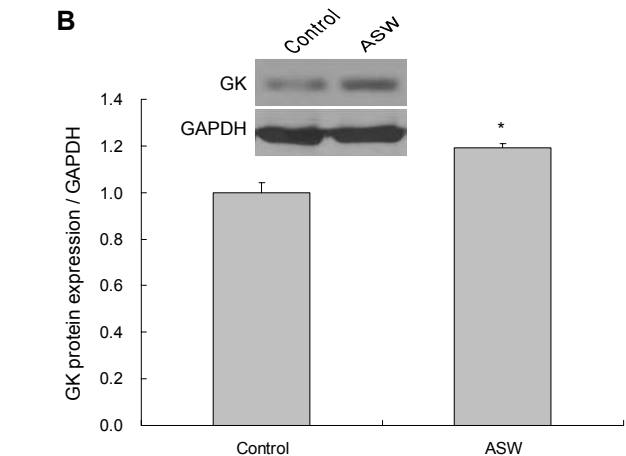
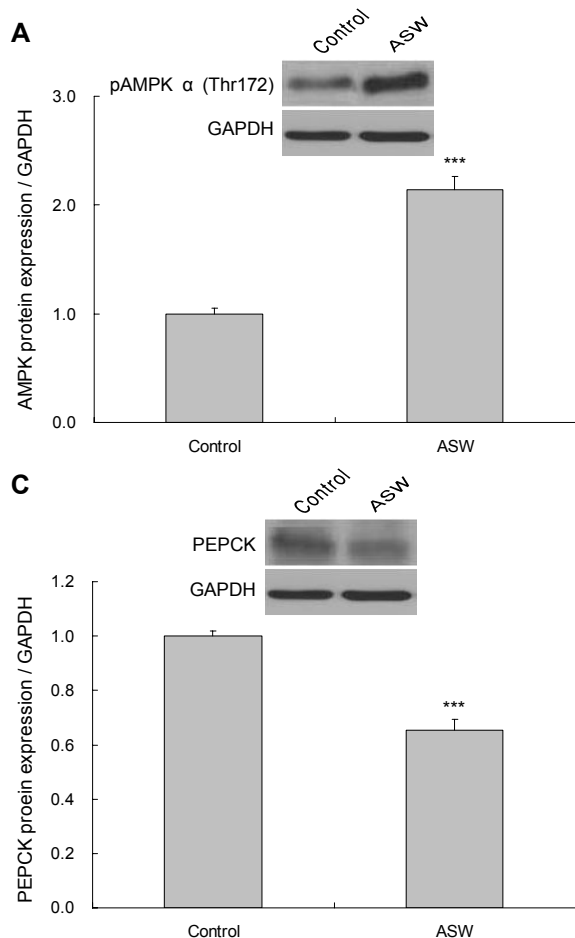
**ASW가 glucokinase(GK) 활성에 미치는 영향**

HepG2 세포에 ASW 1 mg/mL를 0, 2, 6, 12, 24시간 처리한 후 GK의 활성을 측정한 결과 Fig. 4에서 보는 바와

같이 시간 의존적으로 활성이 증가하였다. ASW 처리 후 12, 24시간에서 무처리군 대비 약 1.3배, 1.5배 유의한 수준으로 활성이 증가하였다. GK는 세포에서 포도당 대사에 첫 번째로 관여하는 매우 중요한 조절 효소로써 세포 내로 유입된 포도당의 이용 속도를 증가시키는 효소로 알려져 있다(34). 2형 당뇨병 환자의 간 조직에서 당 이용률이 감소하는 것은 GK 활성과 연관성이 높은 것으로 보고되어 있다(35). 당뇨병과 GK의 활성 연관성에 대한 연구는 녹차 추출물(22), 청미래덩굴 잎 물 추출물(26)과 polydatin(36) 등 다수 보고된 상황이다. ASW 또한 GK 활성 유도를 통해 당뇨 개선 가능성이 기대되는 천연소재로 판단된다.

**ASW가 간세포 내 AMPK에 의한 포도당 이용 대사에 미치는 영향**

AMP-activated protein kinase(AMPK)는 세포의 대사 과정 중 ATP와 ADP를 에너지원으로 사용하여 AMP 생성을 통한 에너지 항상성 유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(37,38). AMPK는 serine/threonine kinase이고 포도당 및 지질대사의 조절 인자로 당뇨와 비만에 중요한 조절 작용을 한다고 알려져 있으며(39-41), 172 threonine(Thr 172)의 인산화를 통해 활성화되는 것으로 보고되어 있다(42). HepG2 세포에 ASW(1 mg/mL)를 24시간 처리한 후



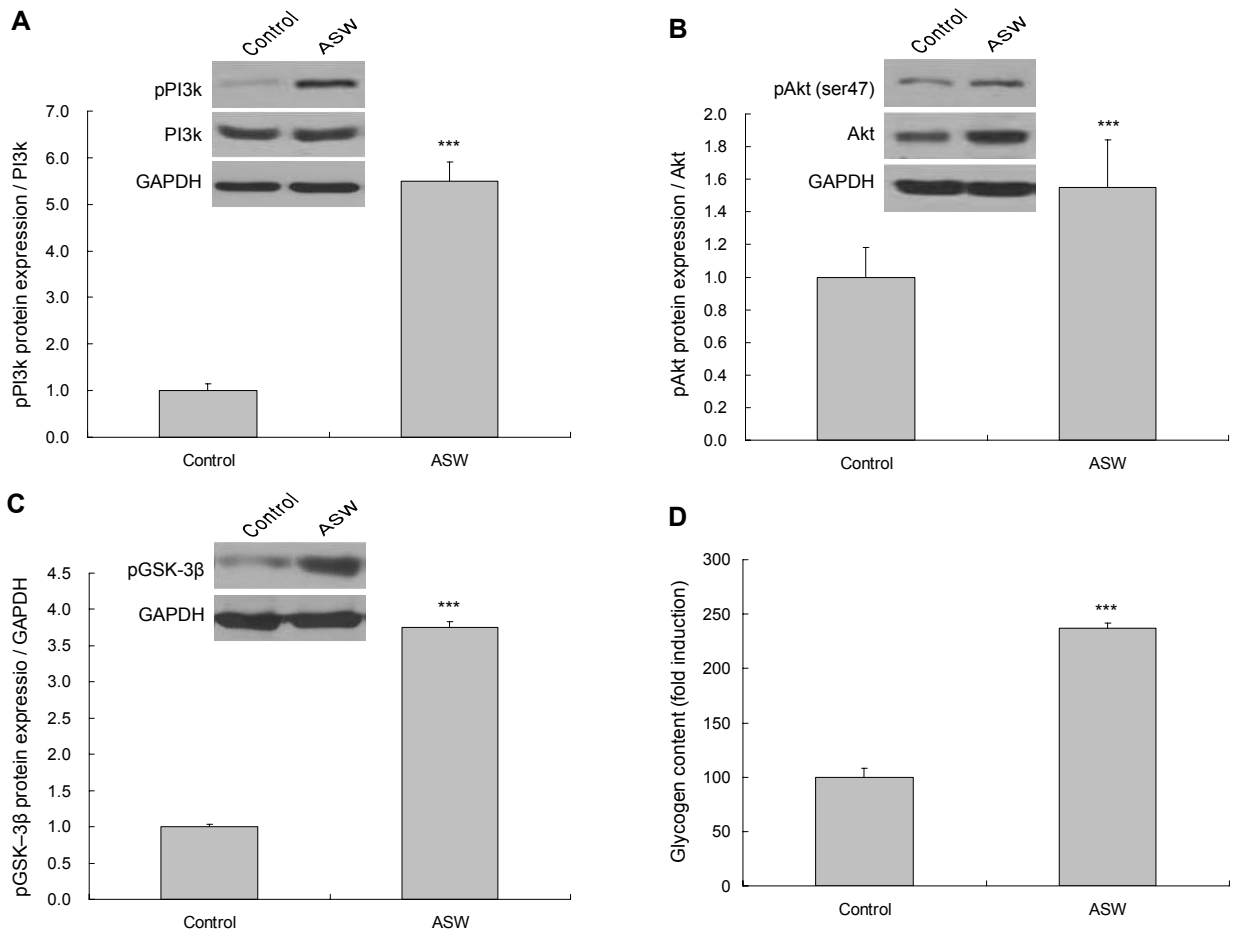
**Fig. 5.** Measurement of glycolysis related enzymes protein expression. HepG2 cells were incubated with *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW, 1.0 mg/mL) for 24 h. (A) Effect of ASW on pAMPK protein expression in HepG2 cells. (B) Effect of ASW on GK protein expression in HepG2 cells. (C) Effect of ASW on PEPCK protein expression in HepG2 cells. Data were expressed as mean values±standard deviation, derived from three independent experiments and comparisons of data were carried out using t-test (n=3), as appropriate. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared control.

pAMPKα(Thr172), GK, phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) protein 발현을 측정하였다(Fig. 5A-C). 실험 결과 무처리군과 비교하여 pAMPKα(Thr172)는 약 2.14배, GK는 1.19배 증가하였으며, PEPCK는 약 0.65배 감소하였다. AMPK는 간에서 포도당 homeostasis를 유지하기 위해 gluconeogenic gene의 발현 억제 및 포도당 재생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(43). 최근의 연구에서는 당 이용대사를 증가시킬 수 있는 AMPK 활성 물질에 대한 다양한 연구가 보고되고 있다(44-46). HepG2 세포에서 ASW 처리에 의해 인산화되어 활성화된 AMPK의 증가로 glycolysis 관련 효소인 GK는 활성화되었으며 gluconeogenesis에 관계있는 PEPCK는 감소되었다. 이는 ASW가 포도당 이용은 증가시키는 반면 포도당 재생성 과정은 억제하여 간 조직에서 포도당 이용대사를 촉진할 수 있음을 보여준다.

### ASW가 glycogen 저장에 미치는 영향

Oosterveer와 Schoonjans(34)는 인산화된 포도당이 에

너지 대사에 사용되거나 glycogen이나 지방으로 합성되어 저장된다고 보고하였다. 따라서 ASW에 의해 인산화된 포도당이 glycogen으로 전환 저장되는 기전을 확인하였다. Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3k)는 세포 내에서 다양한 기전에 작용이 가능한 신호단백질로써 G protein-coupled receptors(GPCR) 또는 insulin receptor(IR)에 의해 자극된다고 알려져 있고(45,47), cell growth, proliferation, differentiation, motility, survival 및 intracellular trafficking과 연관된다(47). PI3k가 protein kinase B(Akt)를 자극하게 되면 Akt에 의해 glycogen synthase kinase 3β(GSK3β)가 인산화되면서 활성화되어 glycogen synthase(GS)의 활성을 증가시키기 때문에 glycogen 저장이 유도된다(48). GS는 GSK-3, AMPK, Akt 및 casein kinase 2(CK2)에 의해 직접 영향을 받는다고 알려져 있다(49). HepG2 세포에 ASW(1.0 mg/mL)를 24시간 처리 후 PI3k, Akt, GSK-3β의 단백질 발현을 측정하였다(Fig. 6A-C). 실험 결과 pPI3k(Tyr458), pAkt(Ser47), pGSK-3β 단백질 발현



**Fig. 6.** Measurement of glucose storage related enzymes protein expression and glycogen contents. HepG2 cells were incubated with *Acanthopanax senticosus* water extract (ASW, 1.0 mg/mL) for 24 h. (A) Effect of ASW on PI3k protein expression in HepG2 cells. (B) Effect of ASW on Akt protein expression in HepG2 cells. (C) Effect of ASW on GSK-3β protein expression in HepG2 cells. (D) Effect of ASW treatment on glycogen contents in HepG2 cells. Data were expressed as mean values±standard deviation, derived from three independent experiments and comparisons of data were carried out using t-test (n=3), as appropriate. \*\*\* $P < 0.001$  compared control.

은 무처리군과 비교하여 약 5.5, 1.65, 3.75배 유의하게 발현이 증가하였다. 세포 내 glycogen 함량 측정 결과(Fig. 6D) 무처리군에 비해 유의하게 약 237.1% 증가하였다. 간 세포에 glucose가 유입되면 insulin independent 상황에서 glucose가 glycogen으로 전환되어 저장될 수 있다는 연구 결과(49)를 바탕으로 ASW가 GS의 활성화에 미치는 직접적인 연구 결과는 확보하지는 못하였으나 PI3k-Akt-GSK3 $\beta$ 로 이어지는 활성화 단계를 확인함으로써 ASW에 의한 glucose의 glycogen 전환 및 저장 기전을 유추할 수 있었다.

오갈피나무의 유효성분으로 seamin, savinin 및 lignan 배당체인 acanthoside A, B, C, D와 chiisanoside polyacetylene,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol이 알려져 있다(50). Ligand 배당체 중 chiisanoside와 acanthoside D는 탄수화물 및 지방 대사 등 생체기능조절에 영향을 주는 주요 성분으로 알려져 있다(51-55). Chiisanoside는 혈당저하작용, 항암효과, 면역기능 증진(51,52), acanthoside D는 간기능 개선, 면역기능 증진 및 콜레스테롤 수치 저하 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(53-55). 따라서 종합적으로 판단할 경우 배당체들이 포도당 수송 및 흡수와 관련된 주요 활성물질로 예측되며, 향후 가시오갈피의 주요 성분 중 어떠한 물질이 작용할 것인지 추가 연구가 진행되어야 할 것이다.

**요 약**

본 연구에서는 가시오갈피 물 추출물(ASW)를 이용하여 아직 시도된 바가 없는 HepG2 세포 내 포도당 유입과정 및 glucokinase(GK) 활성을 통한 포도당 이용대사 실험을 수행하였다. 포도당의 세포 내 유입은 GLUT2의 transcription factor들 중 하나인 HNF-1 $\alpha$ 의 활성화로 GLUT2의 유전자 발현이 증가하여 이루어지는 것을 확인하였다. GK 활성 측정 결과 ASW가 GK를 활성화하여 포도당의 인산화에 영향을 주는 것을 확인하였고 AMP-activated protein kinase의 인산화 증가로 glycolysis에 관여하는 효소인 GK의 단백질 발현은 증가하고, gluconeogenesis에 관여하는 phosphoenolpyruvate carboxykinase의 단백질 발현은 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 인산화된 포도당이 glycogen으로 전환 저장되는 메커니즘을 pPI3k-pAkt-pGSK-3 $\beta$ 의 단계별 단백질 발현을 확인함으로써 검증하였으며, glycogen 함량 측정을 통해 확인하였다. 본 연구를 통해 ASW가 다양한 메커니즘에 작용하여 당뇨의 예방 및 개선에 활용할 수 있는 잠재적 소재임을 확인하였고, 이는 ASW가 천연 기능성 소재로서의 개발가치가 높음을 시사한다.

**감사의 글**

본 연구는 강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터(B0009702) 및 강원대학교 의생명과학연구소(320130015),

2015년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(520150313)의 일부 지원으로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Rotshteyn Y, Zito SW. 2004. Application of modified in vitro screening procedure for identifying herbals possessing sulfonylurea-like activity. *J Ethnopharmacol* 93: 337-344.
2. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. 2011. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94: 311-321.
3. Nepom GT. 1990. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes* 39: 1153-1157.
4. Koivisto VA. 1993. Insulin therapy in type II diabetes. *Diabetes Care* 16: 29-39.
5. Rayfield EJ, Ishimura K. 1987. Environmental factors and insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 3: 925-957.
6. Lee SH, Lee JK, Kim IH. 2012. Trends and perspectives in the development of antidiabetic drugs for type 2 diabetes mellitus. *Korean J Microbiol Biotechnol* 40: 180-185.
7. Salimifar M, Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. 2013. A review on natural products for controlling type 2 diabetes with an emphasis on their mechanisms of actions. *Curr Diabetes Rev* 9: 402-411.
8. Lee WT. 1979. Distribution of *Acanthopanax* plants in Korea. *Korean J Pharmacogn* 10: 103-107.
9. Jung CH, Jung H, Shin YC, Park JH, Jun CY, Kim HM, Yim HS, Shin MG, Bae HS, Kim SH, Ko SG. 2007. *Eleutherococcus senticosus* extract attenuates LPS-induced iNOS expression through the inhibition of Akt and JNK pathways in murine macrophage. *J Ethnopharmacol* 113: 183-187.
10. Lin CC, Huang PC. 2000. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acanthopanax senticosus*. *Phytother Res* 14: 489-494.
11. Sung MS, Jung HY, Choi JH, Lee SC, Choi BH, Park SS. 2014. Preparation of functional healthy drinks by *Acanthopanax senticosus* extracts. *J Life Sci* 24: 959-966.
12. Hibasami H, Fujikawa T, Takeda H, Nishibe S, Satoh T, Fujisawa T, Nakashima K. 2000. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells. *Oncol Rep* 7: 1213-1216.
13. Tang W, Eisenbrand G. 1992. *Chinese drugs of plant origin*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. p 1-12.
14. Brekhman II, Dardymov IV. 1969. Pharmacological investigation of glycosides from ginseng and *Eleutherococcus*. *Lloydia* 32: 46-51.
15. Kwon HO, Lee M, Kim YJ, Kim E, Kim OK. 2016. Beneficial effects of *Acanthopanax senticosus* extract in type II diabetes animal model via down-regulation of advanced glycosylated hemoglobin and glycosylation end products. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 929-937.
16. Lim SH, Park YH, Kwon CJ, Ham HJ, Jeong HN, Kim KH, Ahn YS. 2010. Anti-diabetic and hypoglycemic effect of *Eleutherococcus* spp.. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1761-1768.
17. Choung ES, Bak JP, Choi H, Jang GS, Kang SH, Kang SC, Zee OP. 2008. Effects of antidiabetic and GLUT4 gene expression of *Acanthopanax senticosus* extracts. *Korean J Pharmacogn* 39: 228-232.
18. Kim DJ, Kim JM, Kim TH, Baek JM, Kim HS, Choe M.



2010. Effects of mixed extract from *Lycium chinense*, *Cordyceps militaris*, and *Acanthopanax senticosus* on glucose-regulating enzymes of HepG2 in hyperglycemic conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1257-1262.
19. Ercan P, El SN. 2016. Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chem* 205: 163-169.
  20. Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, An Z, Cherrington AD. 2012. Regulation of hepatic glucose uptake and storage *in vivo*. *Adv Nutr* 3: 286-294.
  21. Mueckler M, Thorens B. 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 34: 121-138.
  22. Sundaram R, Naresh R, Shanthi P, Sachdanandam P. 2013. Modulatory effect of green tea extract on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin and high fat diet induced diabetic rats. *Phytomedicine* 20: 577-584.
  23. Sattiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
  24. Yan F, Dai G, Zheng X. 2016. Mulberry anthocyanin extract ameliorates insulin resistance by regulating PI3K/AKT pathway in HepG2 cells and db/db mice. *J Nutr Biochem* 36: 68-80.
  25. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Goya L, Ramos S. 2014. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 64: 10-19.
  26. Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lee SM, Choe M. 2014. Study of the mechanisms underlying increased glucose absorption in *Smilax china* L. leaf extract-treated HepG2 cells. *J Nutr Health* 47: 167-175.
  27. Urquiaga I, Leighton F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res* 33: 55-64.
  28. Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 24: 1777-1789.
  29. Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee BH. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 44: 337-342.
  30. Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, Thorens B. 1990. The high  $K_m$  glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265: 6548-6551.
  31. David-Silva A, Freitas HS, Okamoto MM, Sabino-Silva R, Schaan BD, Machado UF. 2013. Hepatocyte nuclear factors 1 $\alpha$ /4 $\alpha$  and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (*Slc2a2*) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. *Life Sci* 93: 805-813.
  32. Párrizas M, Maestro MA, Boj SF, Paniagua A, Casamitjana R, Gomis R, Rivera F, Ferrer J. 2001. Hepatic nuclear factor 1- $\alpha$  directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. *Mol Cell Biol* 21: 3234-3243.
  33. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. 2012. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . *J Virol* 86: 12903-12911.
  34. Oosterveer MH, Schoonjans K. 2014. Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cell Mol Life Sci* 71: 1453-1467.
  35. Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A. 1996. Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci* 93: 7225-7230.
  36. Hao J, Chen C, Huang K, Huang J, Li J, Liu P, Huang H. 2014. Polydatin improves glucose and lipid metabolism in experimental diabetes through activating the Akt signaling pathway. *Eur J pharmacol* 745: 152-165.
  37. Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. 1994. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol* 4: 315-324.
  38. Winder WW, Thomson DM. 2007. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys* 47: 332-347.
  39. Hardie DG. 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179-5183.
  40. Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29: 18-24.
  41. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Lyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS, Frevert E. 2006. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 3: 403-416.
  42. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271: 27879-27887.
  43. Zhang BB, Zhou G, Li C. 2009. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9: 407-416.
  44. Lee ES, Uhm KO, Lee YM, Han MS, Lee MS, Park JM, Suh PG, Park SH, Kim HS. 2007. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 854-858.
  45. Lin CL, Lin JK. 2008. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human HepG2 hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res* 52: 930-939.
  46. Ha DT, Trung TN, Hien TT, Dao TT, Yim N, Ngoc TM, Oh WK, Bae KH. 2010. Selected compounds derived from Moutan Cortex stimulated glucose uptake and glycogen synthesis via AMPK activation in human HepG2 cells. *J Ethnopharmacol* 131: 417-424.
  47. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11: 297-305.
  48. Ko SK, Kim JS, Choi YE, Lee SJ, Park KS, Chung SH. 2002. Anti-diabetic effects of mixed water extract from ginseng radix rubra, acanthopanax cortex, and cordyceps. *Korean J Pharmacogn* 33: 337-342.
  49. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. 2002. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 444-451.
  50. Lee KJ, Kang JH, Row KH. 2001. Extraction and purification of acanthoside-D from *Acanthopanax chilsanensis*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 71-75.
  51. Yook CS, Rho YS, Seo SH, Leem JY, Han DR. 1996. Chemical components of *Acanthopanax divaricatus* and anticancer effect in leaves. *Yakhak Hoeji* 40: 251-261.
  52. Kim CJ, Hahn DR. 1980. The biological activity of a new

- glycoside, chiisanoside from *Acanthopanax chiisanensis* Nakai leaves. *Yakhak Hoeji* 24: 123-134.
53. Hahn DR, Kim CJ, Kim JH. 1985. A study on chemical constituents of *Acanthopanax koreanum* Nakai and its pharmacological activities. *Yakhak Hoeji* 29: 357-361.
54. Nishiyama N, Kamegaya T, Iwai A, Saito H, Sanada S, Ida Y, Shoji J. 1985. Effect of *Eleutherococcus senticosus* and its components on sex- and learning-behaviours and tyrosine hydroxylase activities of adrenal gland and hypothalamic regions in chronic stressed mice. *Shoyakugaku Zasshi* 39: 238-242.
55. Brekhman II, Dardymov IV. 1969. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol* 9: 419-430.