

석곡 에탄올 추출물의 항당뇨 약리기전에 관한 연구

박명지¹, 이영주^{2*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 박사 졸업, ²동방문화대학원 약용작물학부 재학 중

A study on Anti-diabetic Mechanism of Ethanol Extract of Dendrobii Herba

Myung-ji Park¹, Yeoung-Ju Lee^{2*}

¹Dr. Wonkwang University Graduate School of Traditional Chinese Medicine

²A student of the Department of Medicinal Crops, Dongbang Culture University

요 약 난초과의 석곡(石斛; Dendrobii herba) 에탄올 추출물(EED)의 항당뇨 활성 및 항당뇨 기전을 조사하였다. 스트렙토 조 토신에 의해 유도된 당뇨병 마우스에서 EED를 하루 4회 경구 투여하여 공복 혈당, 당화혈색소 수치, 인슐린 수치 및 글루탐산 옥살 아세트산 트랜스 아미나 아제 및 글루탐산 피루브산 트랜스 아미나 아제의 간 기능을 감소시키는 실험연구를 통해 그 약리적 기전을 밝혀내고자 했다. EED는 L6 근육 세포에서 세포 내 포도당 섭취뿐만 아니라 RINm5F 베타 세포에서 포도당에 의한 인슐린 분비를 증가시켰다. 따라서 EED는 인슐린 분비를 증가시킬 뿐만 아니라 세포 당 흡수를 증가시킴으로써 항당뇨병 활성을 나타내는데 커다란 가능성을 보여주었으며, 향후 석곡(石斛; Dendrobii herba) 에탄올 추출물에 대한 약리적 기전에 대한 연구가 더욱 활발하게 이루어져 당뇨병 치료에 큰 공헌을 할 수 있게 되기를 기대해본다.

주제어 : 석곡, 항당뇨 효과, α -glucosidase 활성, 포도당 흡수기능, 공복혈당

Abstract Antidiabetic active and anti-sugar mechanisms of the ova family (石斛; Dendrobii herba) ethanol extract (EED) were investigated. The EED was administered orally four times a day in a diabetic mouse induced by strepto Joe Toshin to reveal and reveal its pharmacological miracle through experimental studies that reduce the liver function of empty blood sugar, glythamic oxal acetate levels, insulin levels and glutamic acid trans aminaase and glutamic acid pyruvic acid trans amine. EED increased insulin secretion by glucose in RINm5F beta cells as well as intraperitoneal glucose intakes in L6 muscle cells. Thus, EED has shown great promise in displaying anti-diabetes activity not only by increasing insulin secretion but also by increasing intakes per cell, and hopes that future research on pharmacological mechanisms for quartz (Dendrobii herba) ethanol extract will be more active and contribute greatly to the treatment of diabetes.

Key Words : Dendrobii herba, anti-diabetic effect, α -glucosidase activity, glucose uptake, fasting blood glucose.

*Corresponding Author : Yeoung-Ju Lee(ling3477@naver.com)

Received May 28, 2019
Accepted July 20, 2019

Revised June 28, 2019
Published July 28, 2019

1. 서론

1. 연구 배경 및 목적

우리나라를 비롯하여 세계적으로 당뇨병 인구의 증가는 매우 심각한 상황이다. 2018년도 대한 당뇨병학회에서 발간한 당뇨병 시트(2011~2016년 통합, 국민건강영양조사 기반)에 따르면, 2016년 기준 30세 이상에서 나타나는 대한민국 성인 당뇨의 유병률은 14.4%로 약 500만 명이 넘는 것으로 조사되었으며, 당뇨병 전 단계인 공복혈당장애 유병률 인구 870만 명을 포함한다면 2016년 우리나라에서는 약 1,370만 명이 당 대사 이상을 가지고 있다. 당뇨병의 유병률 증가는 당뇨병성 합병증 발생을 증가시키고 합병증으로 인한 수명 단축과 삶의 질 저하는 개인뿐만 아니라 사회적, 경제적 손실을 가져온다[1].

한의학에서 당뇨병은 소갈(消渴)과 유사한데, 소갈(消渴)은 일종의 소모성 질환으로 많이 먹고 마시며, 소변을 많이 보는데 소변이 단 특징을 가지고 있다[2].

황제내경(黃帝內經) 소문(素問)·〈기병론(奇病論)〉에는 달고 맛좋은 기름진 것은 사람으로 하여금 안으로 열이 나게 하고, 단것은 속이 가득하여 답답하게 한다. 그러므로 그 기(氣)가 위로 넘치게 되면 옮겨져서 소갈(消渴)이 된다. 이를 치료하는 데는 난초(蘭草)로써 목은 기를 제거한다고 하여 소갈의 원인과 증상의 기전 치료에 대해서 논술 한 바 있다[3].

난초과의 약물로는 석곡(石斛), 백급(白及), 천마(天麻) 등이 있으며, 그 중에서 석곡은 위중허열(胃中虛熱)을 없애주고 번갈(煩渴)을 그치게 하는 효능[4]이 있어 소갈 치료에 응용될 수 있으리라 생각되어 항당뇨 효과가 있는지 연구해보고자 하였다.

석곡은 기존의 실험적 연구에서 항산화 작용[5], 골다공증 예방 효과[6], 면역조절 효과[7], 항산화 항염증 미백효과[8], 신경계 질환 예방 효과에 미치는 영향[9] 및 신경세포 보호 효과[10] 등이 보고되었다. 또한, alloxan을 이용하여 당뇨병을 유발한 백서에서 석곡 수용성 추출물의 항당뇨 효과가 보고되었다[11]. 그러나 기존의 이러한 연구는 석곡이 어떠한 약리적 기전에 의해서 항당뇨 효과를 나타내는지 명확하게 설명하지 않았다.

그러하여 본 연구에서는 난초과의 석곡(石斛; *Dendrobii herba*)을 당뇨 치료의 실질적인 약재로 많이 활용할 수 있도록 하기 위해서 기존 연구에서 명확하게 설명하지 않았던 석곡의 약리적 기전 즉, 석곡의 항당뇨 활성 기전을 조사하기 위해 효소, 세포 및 실험동물 수준에서 석

곡 에탄올 추출물의 항당뇨 활성 및 효과를 조사함으로써 유의한 연구결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에 사용된 trypsin-EDTA, tetrazolium bromide salt (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modification Eagle medium (DMEM), RPMI 1640, streptozotocin (STZ), penicillin, streptomycin, α -glucosidase, acarbose, metformin, glucose 및 인슐린은 Sigma-Aldrich 사(USA)로부터, fetal bovine serum (FBS)과 horse serum은 Hyclone 사(USA)로부터 그리고 2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl]amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG)는 Invitrogen 사(USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 석곡은 대구의 휴먼허브에서 구입하였고, 전통의학연구소(원광대학교)에서 형태학적 평가를 통해 동정하였고, 표본이 되는 시료(BD-2018-07-02-1)는 원광대학교 대사성 질환 연구소에 보관하였다. 또한 본 연구에서 사용된 기타 모든 시약은 Merck사(독일)와 Sigma-Aldrich 사에서 구입하였다.

2.2 방법

2.2.1 약물추출 및 제조

본 연구의 실험에 사용한 석곡은 건조한 후 분쇄한 분말 50g을 70% 에탄올과 혼합(질량의 10배[v/w]에 해당)하여, 80°C의 온도에서 2시간 30분 동안 단 회 환류 냉각 추출하였다. 추출물을 qualitative filter paper, ADVANTEC, Japan(정상여과지:일본)로 여과하여, 여액을 N=1000 rotary evaporator, EYELA, Japan(감압농축기:일본)로 농축하였다. 농축액은 ultra-low temperature freezer(초저온 동결기 : NU-6625D36 NuAire, USA)에서 동결 후에 동결건조(PVTFD-10R, Ilshin Lab Co. Ltd. Korea)하여 석곡 에탄올 추출물은 1.58 g (3.17%)을 수득하였다.(이하 EED) 세포실험과 실험동물에 사용된 각 시료는 증류수에 용해 시켜 사용하였다.

2.2.2 α -Glucosidase 저해 활성 측정

효소 수준에서 실험에서는 최종 당 분해 효소인 α -glucosidase 저해 활성을 측정하여 시료의 항당뇨 효과를 결정하였다. 이 실험은 먼저 0.1 M 인산 완충액(인

산 용액에 인산염을 첨가하여 pH의 변화를 억제하는 용액: pH 6.8)에 용해한 2.5 mM의 효소기질(*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 100 μ L)과 0.2 unit/mL에 해당하는 α -glucosidase (효소) 그리고 농도별 시료 추출물 50 μ L을 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이어서 0.1 M NaOH(수산화나트륨) 100 μ L로 반응을 정지시킨 다음에 405 nm 파장에서 시료를 첨가한 반응물의 흡광도 (optical density of sample; ODS)를 측정하였으며, 효소 용액을 첨가하지 않은 반응물의 흡광도(optical density of background; ODB) 및 시료를 첨가하지 않은 반응물의 흡광도(optical density of control; ODC)를 각각 측정하고 아래의 식에 의하여 α -glucosidase 저해 활성을 계산하였다.

$$\text{Inhibition activity (\%)} = \frac{(1 - (ODS - ODB))}{ODC} \times 100$$

2.2.3 세포 배양

세포 수준의 실험에서는 췌장 베타(인슐린 분비세포)-RIN-m5f, ATCC, USA : 세포주)와 L6, KCLB, Korea : 골격 근세포주)를 실험 목적에 맞춰 사용하였다. 각각의 세포주는 10% FBS를 포함한 DMEM 또는 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 배양기(RPMI 1640 배지를 사용하였음)에서 배양하였다. 각각의 세포가 90% 성장하였을 때 실험에 사용하였고, 배양 횟수는 20회(passage)가 넘지 않도록 조절하였다. 배양한 세포는 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 부유시킨 다음에 혈구 계산기로 세포 수를 산정하였다.

2.2.4 세포독성 측정

RINm5F 베타-세포와 L6 근세포의 세포독성은 밀집 세포의 mitochondria (미토콘드리아) 탈수소화 효소에 의하여 자줏빛 formazan(포르마잔) 생성물로 변화하는 MTT 환원을 근간으로 하는 MTT 분석법을 적용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 세포를 2×10^5 cells/well 농도로 48-well plate에 맞춰 배양하여 다양한 농도로 시료를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 5 mg/mL MTT 용액에 100 μ L을 첨가한 뒤 재차 30분간 배양하였다. 이 실험단계에서 생존한 세포로부터 생성된 포르마잔 생성물은 건조된 상태로 회수하고, 동일한 양의 DMSO를 첨가하여 용해 시켰다. 용해된 포르마잔의 양은 일정량의 용해액을 96-well plate에 분주한 뒤 540nm 파장에서 흡광도 측정치를 조사하여 결정했다.

2.2.5 인슐린 분비 측정

RINm5F 베타-세포를 5.0×10^5 cells/well 농도로 하여 6-well plate에 분주하여 시료를 각기 농도별로 처리하고 12시간 동안 배양한 다음, 포도당 15mm로 자극하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 배양액에 있는 인슐린 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit (R&D System, USA)로 측정하였다. ELISA kit 공급자가 제공하는 실험방법에 따라 연구실험을 진행하였고 microplate reader (Molecular Devices)를 사용해서 450nm 파장에서 흡광도 값을 측정한 뒤 인슐린 농도를 조사 계산하였다.

2.2.6 포도당 수송능력 측정

이 실험에서는 첫 번째로 미분화된 L6 myoblast 세포를 L6 myotube 세포로 분화시켰고, 두 번째로, 분화된 myotube 세포에서 포도당 수송능력(glucose uptake)을 측정하였다. 세포 분화는 L6 myoblast 세포를 6-well plate에 분주한 후 2-3일이 되는 시점에서 2% horse serum (Hyclone)을 포함하는 배지로 교환한 후 2일을 경과한 후에 한 번 더 배지를 교환하였다. 세포의 분화상태의 정도를 매일 현미경으로 관찰, 세포 분화가 80-90% 이상 myotube 세포로 분화하였을 쯤 (보통 7-8 일 후) 실험에 사용하였다. 포도당 수송능력 측정을 위해 분화된 L6 myotube 세포를 96-well clear-bottom blackwell plate에서 배양한 후 12시간 동안 포도당이 미첨가된 배지로 교환하여 포도당이 고갈되는 상태로 배양하였다. 그런 다음 다양한 시료와 함께 형광 시약 2-NBDG를 100 μ g/ml의 농도로 만들어 12시간 동안 배양하였다. 포도당 수송능력은 PBS를 이용해 세포를 2회 세척 한 후 형광 microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 여기파장인 480nm 파장과 발광 파장인 535nm 파장에서 형광 세기를 측정한 후 각각 형광 세기를 대조군과 비교하여 측정 결정하였다.

2.2.7 실험동물 및 식이

본 실험의 연구에서 사용한 실험동물은 4주령 수컷 C57BL/6 마우스를 Osan, Korea(샘타코)에서 구입하여, 일주일간의 순화 기간을 거친 후에 사용하였으며, 실험동물의 평균 무게는 18.21 ± 1.24 g이었고, 실험동물의 사육실은 12시간 간격을 두고 명암을 조절하였으며, 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 50~60%를 항상 유지하였다. 모든 동물실험은 원광대학교 동물실험지침(Wonkwang University Guide for Animal Experimentation)에

의한 지침을 준수하여 시행하였으며, 원광대학교의 동물 실험윤리위원회의 승인을 얻어 시행하였다(WKU17-09).

실험동물은 당뇨병을 유발시킨 후, 대조군(control)과 치료 처리 군으로 구분하고 필요에 따라서 양성 대조군(positive control)으로도 구분하였다. 각각의 군에 실험동물을 6마리씩 배정하였고, 농도별 시료는 증류수에 용해 시켜서 1일 1회 경구 투여하고, 대조군은 증류수만 경구 투여하였다. 양성 대조군으로 당뇨병 치료에 사용되는 acarbose와 metformin을 각각 300mg/kg과 200mg/kg으로 증류수에 용해 시켜 1일 1회 경구 투여하였다.

2.2.8 당뇨병 유발

STZ는 2-deoxy-D-glucose에 결합된 1-methyl-1-nitrosourea가 포도당 유도체로서 설치류의 이자에 존재하는 베타-세포에 특이적인 독성을 유발하여 결과적으로는 베타-세포의 인슐린 생성 및 분비를 감소시킴으로써 인슐린이 결핍된 당뇨병을 유발한다. 따라서 STZ는 실험동물(마우스 또는 랫트)에서 제1형 또는 제2형 당뇨병을 유도하는 약물로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 마우스를 16시간 절식한 후에 120mg/kg(체중 기준)의 STZ를 복강에 1회 주사(0.1 M citrate buffer: pH 4.5에 희석)하였고, 정상군에는 0.1 M citrate buffer만 복강에 주사하였다. 2주 후에 당뇨병 유발을 확인하기 위해 16시간 절식시켜, 꼬리 정맥에서 혈액 채취를 하여 혈당 측정기(Glucotrend, Roche 사, Germany)를 이용해 혈당을 측정하였다. 이 경우 공복 혈당이 200mg/dl 이상인 실험동물을 당뇨가 유발된 경우로 보고 선별하여 실험에 적용토록 하였다.

2.2.9 간 기능 손상에 대한 정도 측정

간 기능 지표인 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)와 GPT(glutamic pyruvic transaminase)의 활성은 GOT와 GPT 검사용 ELISA kit (Asan Chemical, Korea)를 이용하여 공급자가 제공한 실험방법에 따라 측정하였다.

2.2.10 경구 자당 및 포도당 내성 검사

경구 자당(蔗糖) 내성 검사(oral sucrose tolerance test; OSTT)와 포도당(葡萄糖) 내성 검사(oral glucose tolerance test; OGTT)는 마우스를 16시간 이상을 절식시킨 후에 자당 또는 포도당 용액을 1g씩(체중 kg당) 경구로 투여한 다음 일정 시간 간격으로 마우스의 꼬리 정맥에서 혈액 채취를 하여 혈당을 측정하였다.

2.2.11 혈청 인슐린 측정

혈청 인슐린양은 실험을 종료하는 시점에서 마우스(실험동물)를 희생시키고 혈액을 심장에서 채취하고 혈액에서 분리한 혈청에서 인슐린 ELISA kit R&D System을 사용하여 혈청 인슐린의 농도를 측정하였다.

실험동물)를 희생시키고 혈액을 심장에서 채취하고 혈액에서 분리한 혈청에서 인슐린 ELISA kit R&D System을 사용하여 혈청 인슐린의 농도를 측정하였다.

2.2.12 당화혈색소 측정

당뇨병 실험동물의 당화혈색소(glycosylated hemoglobin/hemoglobin A1c; HbA1c)는 실험을 종료하는 시점에서 마우스(실험동물)를 희생하여 심장에서 혈액을 채취한 뒤 HbA1c ELISA Kit(MyBioSource, USA)를 사용하여 당화혈색소를 측정하였다.

2.2.13 통계

실험의 결과는 평균 \pm 표준편차(SD)로 표시하였고, 실험군들의 비교는 GraphPad Software, USA(Prism software)를 이용하여 one-way ANOVA로 분석 그리고 사후 검정은 Bonferroni multiple range *t*-test를 이용하였고, 통계적 유의성의 결과는 $P < 0.05$ 로 나타났다.

3. 결과

3.1 α -Glucosidase 효소의 활성

Ethanol extract of Dendrobii herba: EED(석곡에탄올 추출물)이 α -Glucosidase 효소의 활성에 미친 영향을 조사한 결과, 양성 대조군으로 사용한 acarbose 처리에서 농도 의존적인 α -Glucosidase 활성 억제와 EED 처리에 의한 α -Glucosidase 활성 억제의 경향성이 관찰되었다. 이는 acarbose와 비교할 경우 억제 활성의 정도는 크지 않게 관찰되었으며 이는 즉 300 μ g/ml 처리 농도에서 α -Glucosidase 활성 억제의 정도를 비교할 경우 acarbose는 약 80%의 억제 효과를 나타냈지만 EED는 12%의 억제 효과를 나타내었다. Fig. 1과 같다.

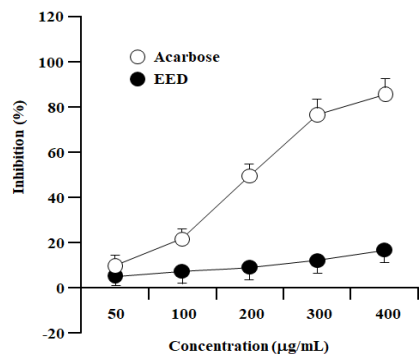


Fig. 1. Effect of EED at different concentrations (50-400 μ g/ml) against α -glucosidase.

3.2 정상 마우스에서 경구 자당 내성 검사

EED가 정상 마우스의 OSTT에 어떠한 영향을 미치는지 조사 결과, EED는 농도 의존적으로 자당에 의해 혈당 상승을 억제하였고, 또한 Acarbose는 자당에 의한 혈당 상승을 억제하는 결과를 보였다. Fig. 2와 같다.

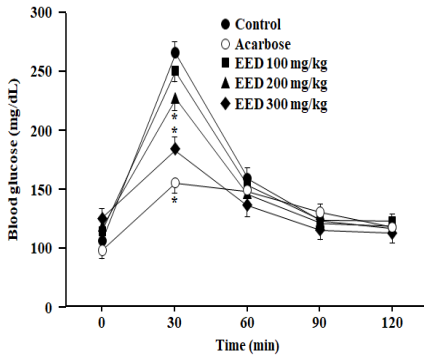


Fig. 2. Effect of EED on blood glucose levels during oral sucrose tolerance test in normoglycemic mice.

3.3 정상 마우스에서 경구 포도당 내성 검사

EED 처리에 있어 정상 마우스의 OGTT에 어떠한 영향을 미치는지 조사 결과, OSTT에서 관찰된 혈당의 감소 경향성과 유사하게, EED는 포도당에 의한 혈당의 상승을 억제하였으며, 양성 대조군으로 사용된 metformin 역시 혈당을 감소시키는 결과를 보였다. Fig. 3과 같다.

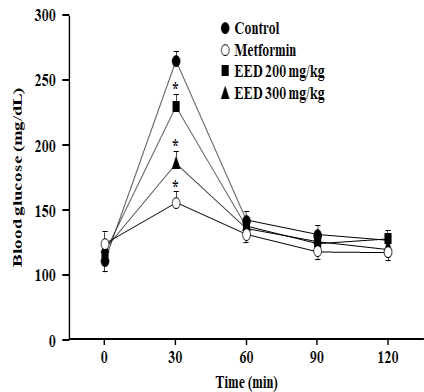


Fig. 3. Effect of EED on blood glucose levels during oral glucose tolerance test in normoglycemic mice.

3.4 베타-세포에서 인슐린 분비 활성화

EED 처리가 RINm5F 베타-세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위해 시료를 24시간 RINm5F 세포에

100, 200, 300 μ g/ml로 처리한 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군과 유의적인 차이를 볼 수 없었고(data not shown), 세포의 독성이 나타나지 않는 농도에서 EED 처리가 RINm5F 세포의 인슐린 분비에 미치는 효과를 조사한 결과, 양성 대조군으로 사용된 고농도의 포도당 자극은 인슐린 분비를 유도하였고 EED 처리는 포도당-유도 인슐린 분비를 농도 의존적으로 증가시키는 결과를 보였다. Fig. 4와 같다.

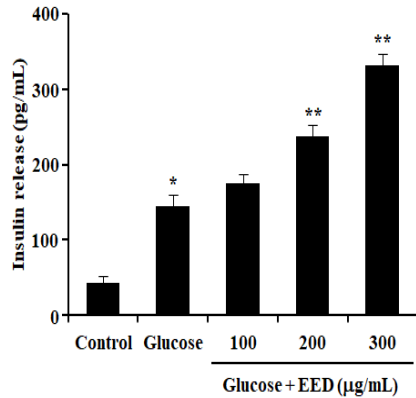


Fig. 4. Effect of EED on insulin secretion in RINm5F cells.

3.5 근 세포에서 포도당 흡수 활성화

EED 처리가 분화된 L6 근 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위해 시료를 24시간 근세포에 100, 200, 300 μ g/ml로 처리한 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군과 유의적인 차이를 볼 수 없었고(data not shown), 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 EED 처리가 분화된 L6 근세포의 포도당 흡수에 미치는 효과를 조사 결과, 10 nM 농도의 인슐린은 대조군과 비교하여 포도당 흡수를 약 3배 정도 증가시켰고 EED 또한 포도당 흡수를 농도 의존적으로 증가시켰다. Fig. 5와 같다.

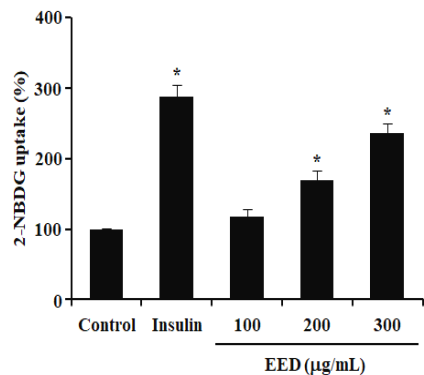


Fig. 5. Effect of EED on glucose uptake in L6 myotube cells.

3.6 당뇨 마우스에서 공복혈당

STZ 유발 당뇨 마우스에 4주 동안 하루 1회 EED(300mg/kg)를 경구적으로 투여 관리하며 혈당 수치를 매주 측정하였다. 그 결과 초기에는 혈당값이 대조군과 metformin을 투여한 양성 대조군 사이에서 유의미한 차이가 있었으나 EED를 투여한 실험군에서는 대조군과 큰 차이가 없었으며 시간이 경과함에 따라 혈당치 증가가 대조군에서 확인되었고 EED를 투여한 실험군에서 2주째부터 공복 혈당 수치가 감소하기 시작하는 현상을 보여 대조군과 큰 차이를 보이기 시작했다. 식곡 추출물이 당뇨병을 치료하는데 있어 그 효능을 평가하는 데 의미있는 실험으로 그 결과는 그래프에 나타난 각 점에 6마리 생쥐의 평균 ± SD를 볼 수 있다. Fig. 6과 같다.

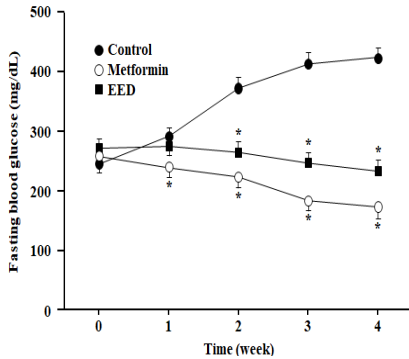


Fig. 6. Effect of EED on fasting blood glucose levels in STZ-diabetic mice.

3.7 당뇨 마우스에서 당화혈색소

STZ-유발 당뇨 마우스에 4주 동안 하루 1회 EED(300mg/kg)를 경구적으로 투여 관리하고, 4주째에 HbA1c(당화혈색소)를 측정하였다. HbA1c(당화혈색소)의 변화는 4주째 혈당치 변화와 유사한 결과를 보였다. (Fig. 6) 이는 대조군에서 증가된 당화혈색소가 EED와 metformin에 의해 유의적인 감소를 보였다. Fig. 7과 같다.

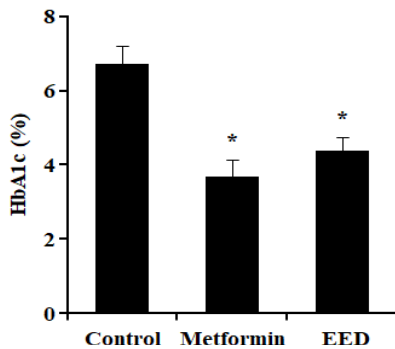


Fig. 7. Effect of EED on glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in STZ-diabetic mice.

3.8 당뇨 마우스에서 혈중 인슐린

STZ-유발 당뇨 마우스에 4주 동안 하루 1회 EED(300mg/kg)를 경구적으로 투여 관리하고, 혈액을 채취하여 혈중 인슐린 농도를 측정하였다. 정상 마우스의 혈중 인슐린 농도는 400 ± 15.1 pg/ml ($n=6, p < 0.05$)로 관찰되었으며 당뇨 마우스에서는 혈중 인슐린 농도가 정상 마우스보다 약 4배 감소하였는데 이 수치는 EED 및 metformin 처리에 의해 유의한 증가를 보였다. Fig. 8과 같다.

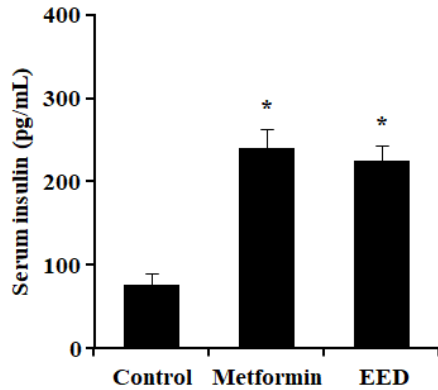


Fig. 8. Effect of EED on serum insulin levels in STZ-diabetic mice.

3.9 당뇨 마우스에서 GOT 및 GPT 활성

STZ-유발 당뇨 마우스에 4주 동안 하루 1회 EED(300mg/kg)를 경구적으로 투여 관리하고, 혈액을 채취하여 혈중 GOT와 GPT 활성을 측정하였다. 당뇨 마우스의 GOT 활성은 정상 마우스보다 약 2배로 증가하였다. Fig. 9와 같다.

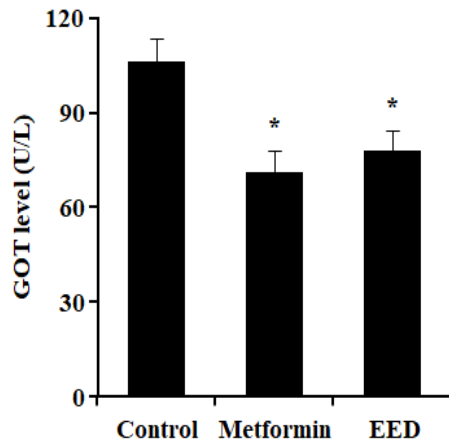


Fig. 9. Effect of EED on GOT levels in STZ-diabetic mice.

당뇨 마우스의 GPT 활성은 경유는 정상 마우스보다 약 5배 증가하였는데 이것은 모두 EED 및 metformin 처리에 의해 유의하게 감소하였다. Fig. 10과 같다.

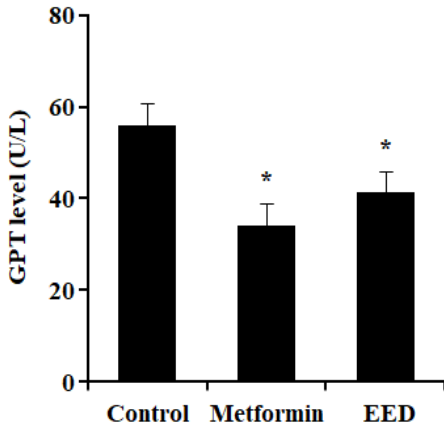


Fig. 10. Effect of EED on GPT levels in STZ-diabetic mice.

4. 고찰

당뇨병은 인슐린의 결핍으로 인한 혈액 내의 포도당 수치가 높아져 나타나는 대사성 질병으로 American Diabetes Association, ADA(미국 당뇨학회)에서는 일반적인 범주로 제1형의 당뇨병과, 제2형의 당뇨병 그리고 임신성 당뇨병 (GDM) 등으로 분류하고 있다[12].

당뇨병의 치료는 식이조절 및 운동요법을 바탕으로, 인슐린 억제 내지는 경구용 혈당강하제가 사용되고 있으며, 이러한 경구용 혈당강하제는 각각 극심한 유산 혈증과 저혈당으로 인한 부작용을 동반한다[13]. 이런 부작용을 타파하기 위해 요즘에는 Acarbose와 같은 α -glucosidase 저해제가 사용되고 있으며, 이 α -glucosidase 저해제는 소장에서의 α -glucosidase의 기능을 억제하고 포도당 흡수를 지연시켜 당뇨병 환자에게 문제가 되는 식후 고혈당 및 고인슐린 혈증을 개선하는 동시에 저혈당이 유발하지 않도록 해 주는 장점을 갖고 있는 것으로 보고되었다[14]. 하지만 이러한 약물들은 장기간 복용하게 되면 속쓰림, 메스꺼움, 구토 설사, 저혈당, 체중증가, 간독성, 젖산 혈증 등과 같은 부작용이 크게 동반되어 사용에 제한을 받고 있다[15]. 따라서 이 같은 부작용을 감소시키고 장기복용에도 우수한 안전성을 보장할 수 있는 당뇨병 치료제의 개발이 필요하다. 이러한 필요성에 따라서,

천연물로부터 당뇨병 치료 약물을 발견하려는 탐색과 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 1990년부터는 WHO에서도 당뇨병의 치료에 효과가 있고 부작용이 적은 천연물의 이용을 적극적으로 추천하였다[16].

석곡(石斛, *Dendrobii herba*)은 난초과(科, *Orchidaceae*)에 속한 *Dendrobium nobile* Lindley(금채석곡:金釵石斛) 또는 동속근연식물(同屬近緣植物)의 지상부로서 성(性)은 미한(微寒)하고 미(味)는 감(甘)하며, 위(胃)와 신(腎)으로 귀경(歸經)하고, 益胃生津(익위생진), 滋陰清熱(자음청열) 등의 효능이 있어 熱病傷津(열병상진), 口乾煩渴(구건번갈), 病後虛熱(병후허열), 目暗不明(목암불명) 등의 병증에 이용되었다[17].

본 연구는 70% 에탄올로 추출한 석곡 추출물의 항당뇨 활성을 효소, 세포 및 실험동물 수준에서 조사하여, 석곡의 합리적인 항당뇨 약리기전을 제시하고자 하였고 석곡 추출물이 α -glucosidase의 효소 활성에 어떠한 효과를 나타내는지 조사하였다. 이 실험결과에서 석곡 추출물은 α -glucosidase 효소 활성을 억제하는 경향성을 보였다. 그러나 양성 대조군으로 사용된 acarbose의 효과와 비교해 본 경우, 석곡 추출물의 억제 효과는 크다고 볼 수 없었다. (Fig. 1)

그럼에도 불구하고, 포도당과 과당이 중합된 이당류로서 소장의 α -glucosidase에 의해 포도당과 과당으로 소화되어 소장의 brush-border membrane(미세융모막)에 존재하는 SGLT1[sodium-glucose linked transporter]을 통해 혈관으로 흡수됨으로써 혈당을 상승시키는 자당(蔗糖, sucrose)[19] 동물실험을 이용하는 OSTT의 실험 결과에서는 석곡 추출물의 항당뇨 효과가 관찰되었다 (Fig. 2). 포도당(glucose)은 자당(sucrose)과 다르게 α -glucosidase 효소 활성에 의존하지 않고 소장에서 체내로 흡수되어 혈당을 증가시킨다[19]. 또한, 자당(sucrose)을 사용하는 OSTT와 다르게 α -glucosidase 활성에 의존하지 않는 순수 포도당(glucose)을 사용하는 OGTT의 실험결과에서도 석곡 추출물은 OSTT에서 얻은 실험결과와 유사한 경향성으로 혈당을 감소시켰다 (Fig. 3). 이러한 실험의 결과는 석곡 추출물은 α -glucosidase 활성 억제와 관련이 없는 다른 경로를 통해서 항당뇨 효과를 나타내는 것을 의미한다.

제2형 당뇨병은 혈액에 포도당 농도가 비정상적으로 높은 질환을 말한다. 이렇게 혈액의 포도당 농도가 높은 이유는 pancreas(이자)의 Langerhans' islets(랑게르한스섬)에 있는 베타-세포(β -cell)에서 인슐린이 충분하게 분비되었지만, 인슐린 저항성이 생겨 인슐린에 대한 반응이 감소하여 근육, 간 등에서 포도당이 적절하게 소비되

지 않기 때문이다[18]. 임상에서 당뇨병 치료에 사용되는 sulfonyleurea 계통의 약물은 베타-세포에 작용하여 인슐린 분비를 증가시킴으로써 혈당을 감소시킨다[20]. 이와 대조적으로 당뇨병 치료에 사용되는 biguanide 계통의 약물인 metformin은 간에서 포도당 생성을 억제하고 조직 세포들의 포도당 흡수기능을 증가시키고 인슐린 분비를 증가시킴으로써 혈당 상승을 억제시켜 항당뇨 효과를 나타낸다[21](Fig. 3). 본 연구의 세포 수준의 실험에서, 석곡 추출물은 베타-세포의 인슐린 분비를 농도의존적으로 증가시켰을 뿐만 아니라 근 세포의 포도당 흡수 기능 역시 농도 의존적으로 증가시켰다. 이러한 실험 결과는 석곡 추출물의 항당뇨 효과가 베타-세포의 인슐린 분비 증가 효과와 관련이 있을 뿐만 아니라 조직 세포의 포도당 흡수 증가 효과와도 또한 관련이 있다는 것을 의미한다.

Fig. 1, Fig. 2 및 Fig. 3에서 관찰된 실험결과를 종합해보면, 석곡 추출물은 α -glucosidase 효소 활성과 관련이 없는 metformin과 유사한 경로로 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 판단되며, 석곡 추출물(EED)은 α -glucosidase 활성과 무관하게 베타-세포의 인슐린 분비와 조직 세포의 포도당 흡수의 기능을 증가시킴으로써 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 판단된다(Fig. 4, 5).

이러한 약리기전으로 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 추정되는 석곡 추출물의 치료효능을 평가하기 위하여, 본 연구에서는 STZ-유도 당뇨 마우스에 석곡 추출물을 4주간 투여하고, 일정한 시간 간격으로 공복혈당(fasting blood glucose)을 조사함으로써 석곡 추출물의 당뇨병 치료효능을 평가하였다(Fig. 6).

STZ-유도 당뇨 마우스에서 석곡 추출물은 공복혈당을 유의하게 감소시켰다. 또한, 당뇨의 지표 및 혈당조절의 지표로 사용되는 당화혈색소의 수치도 당뇨 대조군의 수치와 비교할 경우, 석곡 추출물에 의해서 유의하게 감소되었다(Fig. 7). 석곡 추출물이 혈당을 낮추고, 그 결과에 의해서 당화혈색소 형성이 감소한 것으로 판단된다. 혈중 인슐린 수치를 볼 때, 당뇨 대조군과 비교하여 석곡 추출물을 투여한 실험 군에서 인슐린 수치의 유의성 있는 증가를 관찰할 수 있었으며, 이 결과는 세포 수준에서 관찰된 석곡 추출물의 인슐린 분비 증가 효과와 잘 일치한다. 양성 대조군으로 사용된 당뇨병 치료 약물인 metformin을 투여한 군에서도 인슐린 수치가 유의하게 증가하였다. 당뇨 마우스에서 장기간의 고혈당은 여러 장기에 손상을 유발하며, 특히, 간의 손상은 실험적으로 측정이 용이하다.

STZ-유발 당뇨 마우스에서는 간 손상 지표인 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)와 GPT(glutamic pyruvic transaminase)수치가 정상 마우스에서보다 높게 나타나며, 이것은 STZ 독성과 높아진 혈당으로 간 기능이 정상보다 감소되었기 때문에 나타나는 것으로 판단된다[22].

본 연구에서도 STZ-유도 당뇨 마우스의 혈중 GOT 및 GPT 수치가 정상 마우스보다 높게 관찰되었으며, 석곡 추출물 및 metformin 처리에 의해서 GOT 및 GPT 수치가 유의하게 감소하였다.(Fig. 9, 10) 이러한 결과는 석곡 추출물과 metformin의 항당뇨 효과가 일정 부분 영향을 주었기 때문으로 판단된다. 아울러, 이 실험으로 4주간의 석곡 추출물 섭취 때문에 유발될 가능성이 있는 약물 독성 중의 하나인 간독성이 본 연구에서는 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다. STZ-유발 당뇨 마우스 실험에서 한 가지 흥미로운 점은 석곡 추출물은 metformin과 유사한 경향성으로 항당뇨 및 간 보호 효과를 보였다. 이러한 사실은 석곡 추출물과 metformin의 항당뇨 기전이 유사하기 때문에 나타난 관찰결과로 판단된다. 최근 연구에 따르면, metformin은 조직 세포의 포도당 흡수를 증가시키고 인슐린 분비를 증가시킴으로써 항당뇨 효과를 나타낸다[23].

석곡에는 다량의 dendrobine 알칼로이드($C_{16}H_{25}O_2N$)와 소량의 dendrobine과 유사한 알칼로이드가 함유되어 있다[24]. 이들 알칼로이드는 혈액 내의 포도당 농도를 조절하는 간에 직접적으로 작용하여 간의 포도당 흡수를 촉진하는 Glut-2 및 Glut-4 유전자 활성 및 단백질 발현을 증가시키고, 포도당으로부터 지방을 합성하는 여러 유전자 및 단백질을 활성화시켜 포도당 소비를 증가시킨다[24]. 따라서 본 연구에서 관찰된 석곡의 항당뇨 효과는 dendrobine 알칼로이드의 포도당 흡수 및 소비 증가 효과와 어느 정도는 관련이 있다는 것을 추론할 수 있다.

종합적으로, 석곡은 베타-세포의 인슐린 분비를 증가시키고 조직 세포의 포도당 흡수를 증가시킴으로써 혈당을 감소시키는 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 판단된다. STZ-유발 당뇨 마우스에서 석곡에 의한 공복혈당의 감소, 당화혈색소 수치의 감소 그리고 GOT 및 GPT 수치의 감소 효과는 석곡의 항당뇨 효과에 의한 것으로 판단된다.

동의보감의 소갈 증상에 들어가는 처방은 麥門冬飲子(맥문동음자), 降心湯(강심탕), 人參石膏湯(인삼석고탕), 淸心蓮子飲(청심연자음), 和血益氣湯(화혈익기탕), 生津養血湯(생진양혈탕), 黃芩湯(황금탕), 生津甘露湯(생진감로탕), 順氣散(순기산), 黃連豬肚丸(황련저두환), 人參茯苓散(인삼복령산), 加減腎氣丸(가감신기환), 補腎地黃元(보

신지황원), 鹿茸丸(녹용환) 등이 수록되어 있으나 위 소갈 치료 처방을 살펴봤을 때 석곡을 처방전에 사용한 경우가 없었다[2]. 본 연구를 통해 얻어진 석곡 에탄올 추출물이 항당뇨 효과에서 유의한 결과를 나타냄에 따라 소갈 처방에 석곡이 사용되면 더 효과를 얻게 될 것이라 생각된다. 다만 본 연구에서는 석곡 에탄올 추출물에 대한 연구만 이루어졌으나 향후에는 탕재로 활용되기 위해 수용성 추출물의 또 다른 약리전 기전을 확인할 필요가 있으며, 좀 더 심도 깊은 임상 연구가 필요하다고 사료 된다.

5. 결론

석곡의 항당뇨 활성 기전을 제시하기 위하여, 석곡 에탄올 추출물의 항당뇨 효과를 소화효소 수준, 세포 수준 및 실험동물 수준에서 조사하고, STZ- 투여에 의해 당뇨병이 유발된 마우스에서 석곡 에탄올 추출물의 당뇨병의 개선 효과를 확인하여, 아래와 같은 결론을 얻었다.

1) 탄수화물을 포도당으로 분해하는 최종 소화효소인 α -glucosidase의 활성 억제 효과를 조사하는 효소 수준의 실험에서, 석곡 에탄올 추출물은 α -glucosidase 활성에 큰 변화를 주지 못했다. 이 결과는 실험동물을 이용한 OSTT와 OGTT에서 검증되었다.

2) 베타-세포를 이용한 인슐린 분비 활성의 조사와 근 세포를 이용한 포도당 흡수 활성을 조사하는 세포 수준의 실험에서, 석곡 에탄올 추출물은 인슐린 분비 활성과 포도당 흡수 활성을 농도 의존적으로 증가시켰다.

3) STZ-유발 당뇨 마우스를 이용한 석곡 에탄올 추출물의 항당뇨 효능평가에서, 4주간의 석곡 에탄올 추출물의 경구 투여는 당뇨 마우스의 공복혈당을 감소시켰고, 혈중 인슐린 분비를 증가시켰으며, 당화혈색소 수치와 간 기능 수치를 개선시켰다.

이상의 결과로부터 석곡 에탄올 추출물은 베타-세포의 인슐린 분비를 증가시키고, 조직 세포의 포도당 흡수를 증가시킴으로써 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 판단 된다.

REFERENCES

[1] S. H. Yoo. (2018). How to test diabetes complications. *Proceedings of KAIM Autumn Conference 2018, 2018(2)*, 166-168.

[2] J. Heo. (1994). *Donguibogam*. Seoul : Yeogang Publishing Co.

[3] H. J. Choi. (2004). *The emperor's inner circle rumor (sang)*. Seoul : Free Books.

[4] C. M. Kim. (1997). *The chinese medicines dictionary*. Seoul : Jungdam.

[5] Y. G. Kim, G. H. Yang & S. I. Cho. (2005). *Anti-oxidative effects of dendrobii herba on toxic agent induced kidney cell injury*. Master's thesis. Dongshin University, Naju.

[6] H. J. Han, J. H. Kim, H. B. Cho & G. S. Choi. (2000). Effects of herba dendrobii on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *The Journal Of Oriental Gynecology, 13(2)*, 120-135.

[7] S. D. Park et al. (2007). Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted adenophorae radix, liriopsis tuber, dendrobii herba, polygonati odorati rhizoma and polygonati rhizoma. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology, 21(2)*, 414-424.

[8] M. HwangBo, S. S. Roh & H. S. Seo. (2010). Effects of dendrobii herba and punica granatum extract on the anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-wrinkle and whitening. *The Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology, 23(3)*, 11-32.

[9] M. Ohsugi et al. (1999). Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of rhodiola sacra. *Journal of Ethnopharmacology, 67(1)*, 111-119. DOI : 10.1016/s0378-8741(98)00245-1

[10] M. Y. Yoon et al. (2007). Protective effect of methanolic extracts from dendrobium nobile Lindl. on H2O2-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 50(1)*, 63-67.

[11] K. J. Lee. (1991). *Studies on the effect of panax ginseng(Red ginseng) and dendrobium moniliforme on metabolites of alloxan induced diabetic rats*. Master's thesis. Dongguk University, Seoul.

[12] American Diabetes Association. (2018). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care, 41(Supplement 1)*, S13-S27. DOI : 10.2337/dc18-s002

[13] Taylor. R. (2013). Type 2 diabetes: Etiology and reversibility. *Diabetes Care, 36(4)*, 1047-1055. DOI : 10.2337/dc12-1805

[14] J. C. Ra, J. H. Bae, H. G. Park & K. S. Kang. (2003). Studies on a new alimentotherapy for diabetic patients. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 32(4)*, 614-620. DOI : 10.3746/jkfn.2003.32.4.614

[15] S. Y. Rhee. (2018). Monotherapy in type 2 diabetes mellitus patients 2017: A position statement of the korean diabetes association. *The Journal of Korean*

Diabetes, 19(1), 15-22. DOI : 10.4093/jkd.2018.19.1.15

- [16] J. K. Grover, V. Vats & S. S. Rathi. (2000). Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 461-470.
DOI : 10.1016/s0378-8741(00)00319-6
- [17] Herbology department of all-korea oriental medicine colleges. (2004). *Herbology*. Seoul : Youngrimsa.
- [18] J. Keizer & G. Magnus. (1989). ATP-sensitive potassium channel and bursting in the pancreatic beta cell. A theoretical study. *Biophysical Journal*, 56(2), 229-242.
DOI : 10.1016/s0006-3495(89)82669-4
- [19] N. Kerru, A. Singh-Pillay, P. Awolade & P. Singh. (2018). Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 152, 436-488.
DOI : 10.1016/j.ejmech.2018.04.061
- [20] S. Seino. (2012). Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. *Diabetologia*, 55(8), 2096-2108.
DOI : 10.1007/s00125-012-2562-9
- [21] C. R. Sirtori et al. (1978). Disposition of metformin (N,N-dimethylbiguanide) in man. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 24(6), 683-693.
DOI : 10.1002/cpt1978246683
- [22] X. Han et al. (2017). Metformin ameliorates insulinitis in STZ-induced diabetic mice. *PeerJ*, 5, e3155.
DOI : 10.7717/peerj.3155
- [23] S. H. Park & G. Y. Kim. (2010). Blood glucose level, insulin content and biochemical variables of complex extract from oriental medicinal plants on diabetes rats. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 23(2), 258-268.
- [24] Y.-Y. Xu et al. (2017). *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids regulate metabolism gene expression in livers of mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(10), 1409-1417.
DOI : 10.1111/jphp.12778

이 영 주 (Yeoung-Ju Lee)

[장학원]



- 2018년 3월 ~ 현재 : 동방문화대학원 대학교 약용작물학, 박사과정 중
- 관심분야 : 약용작물, 약용차, 약용 작물재배
- E-Mail : ling3477@naver.com

박 명 지 (Myung-Ji Park)

[장학원]



- 2018년 10월 ~ 현재 : (사)한국약용작물교육협회교육이사(전문강사)
- 관심분야 : 당뇨, 비만
- E-Mail : ronyjoy69@naver.com