

도라지 종자 추출물의 처리가 제2형 당뇨 *db/db* 마우스의 혈당개선에 미치는 효과

김태영¹ · 김석중² · 임지영^{1,*}

¹국민대학교 식품영양학과, ²동덕여자대학교 식품영양학과

Improvement of blood glucose control in type 2 diabetic *db/db* mice using *Platycodon grandiflorum* seed extract

Tae Yeong Kim¹, Seok Joong Kim², and Jee-Young Imm^{1,*}

¹Department of Foods and Nutrition, Kookmin University

²Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University

Abstract The biological activities of *Platycodon grandiflorum* (PG) root extracts have been studied intensively, whereas there are limited number of studies on PG seed extract (PGSE). PGSE was prepared by ethanol extraction, and its antidiabetic effect was evaluated in mice with type 2 diabetes (C57BLKS/J-*db/db*). Results indicated that the administration of high-dose PGSE (600 mg/kg, wb) significantly stabilized the blood glucose levels, as evidenced by the results of the oral glucose tolerance test. Mice treated with high-dose PGSE exhibited significantly lower serum hemoglobin A1c, insulin, and leptin levels after eight weeks of feeding trial ($p < 0.05$). High-dose PGSE administration significantly improved glucose uptake in the femoral muscle of *db/db* mice by activating both IRS-1/PI3K/AKT/AS160 and AMPK phosphorylation pathways. GLUT4 translocation from the cytosol to the plasma membrane increased 1.7-fold in the PGSE high-dose group. These results suggest that PGSE has potential for development as an antidiabetic agent.

Keywords: *Platycodon grandiflorum*, seed extract, *db/db* mice, anti-diabetic effect, cell signaling

서 론

대사증후군(Metabolic syndrome)이란 복부비만, 당뇨, 콜레스테롤, 고혈압, 중성지방 등 5가지 지표 중 3가지 이상이 기준치를 초과한 상태를 말하며 그 기전은 인슐린 저항성(insulin resistance)으로 보고되었다(Park 등, 2003). 인슐린 저항성이란 일반적으로 포도당 섭취, 당 대사, 포도당 저장에 대한 인슐린의 내성을 의미하는데, 제2형 당뇨에서 인슐린 저항성은 인슐린 자극에 의한 골격근에서의 포도당 흡수 및 대사 감소를 초래하여 혈당을 증가시키는 중요한 원인이 된다. 또한, 인슐린 저항성은 지질 대사의 이상을 일으켜 중성 지방을 상승시키며, 고혈압으로의 진행을 촉진하고 혈류의 흐름을 방해하는 체내 대사의 총체적 교란의 원인이 된다(Shulman, 2000). 전체 당뇨환자의 약 90%를 차지하는 제2형 당뇨 환자수는 비만 환자의 증가와 함께 지속적으로 증가하고 있으며 중국, 인도를 비롯한 개발도상국의 당뇨 유병율은 매우 빠른 속도로 증가하고 있다(Chen 등, 2012).

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 초롱과에 속하는 다년생 여러해살이풀로 한국을 비롯한 중국, 일본 등지에 자생하며 뿌리를 식용으로 사용하여 왔다. 한방에서는 도라지 뿌리를 건조한 것을

길경이라 하여 기관지염, 천식 등의 호흡기 질환의 약재로 사용해 왔으며 도라지 뿌리의 주요 기능 성분은 triterpenoid 사포닌인 platycodin D로 보고되었다(Park 등, 2007; Nyakudya 등, 2014).

일반적으로 식물의 종자는 발사에 필요한 정보를 보호하기 위한 생체물질을 함유하고 있으며 생육이 어려운 건조, 저온 및 높은 염도 조건과 같은 외부 환경 조건에 대한 높은 저항을 위한 polyphenol 등을 다량 함유하고 있다(Tsao, 2010). 종자 추출물 중 가장 연구가 많이 진행된 소재는 포도 종자 추출물로 다양한 효능의 평가가 진행되었으며, 이 중 Sivaprakasapillai 등(2009)은 대사 증후군을 겪고 있는 40세 이상 성인 27명을 대상으로 한 연구에서 포도씨 종자 추출물을 하루에 150 mg 이상 섭취 시 혈압을 유의적으로 감소시킨다고 보고하였다. 또한 망고(*Mangifera indica* L.) 종자 추출물은 다양한 미생물에 대한 항균활성을 보유하고 있다고 보고된 바 있다(EI-Gied 등, 2012).

현재까지 도라지종자 추출물의 기능성 평가에 대한 연구는 매우 제한적이다. 동일한 추출 조건으로 제조한 도라지 종자와 도라지 뿌리의 에탄올 추출물을 가지고 수행한 선행연구 결과에 따르면 종자 추출물이 뿌리 추출물과 비교하여 사포닌의 함량은 유사하였지만 유의적으로 높은 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 가지고 있음을 보고하였다(Yoon 등, 2018). 또한, palmitic acid를 처리하여 인슐린 저항성을 유도한 C2C12 근육세포 모델에서 종자 추출물은 뿌리추출물 보다 높은 포도당 흡수 촉진 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 본 연구는 *in vitro* 모델에서 관찰된 도라지 종자추출물의 효과가 동물모델에서 동일하게 나타나는지 여부를 검증하기 위하여 제2형 당뇨형 동물모델인 *db/db* 마우스를

*Corresponding author: Jee-Young Imm, Department of Foods and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea
Tel: +82-2-910-4772; Fax: +82-2-910-5249
E-mail: jyimm@kookmin.ac.kr

Received December 13, 2019; revised December 30, 2019;
accepted December 31, 2019

이용하여 혈당조절 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 분석 키트

당화혈색소 분석에 사용한 Hemoglobin A_{1c} ELISA kit는 Bio-vision (Mountain view, CA, USA) 제품을 사용하였으며, insulin 및 leptin ELISA kit는 Crystal Chem. Inc. (Downers Grove, IL, USA) 제품을 사용하였다. Plasma membrane protein extraction kit는 Abcam (Cambridge, MA, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Western blot에 사용된 Chemiluminescence detection kit와 horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 제품을 사용하였다. Phospho-IRS-1 (Tyr⁸⁹⁹), IRS-1, phospho-PI3K (Tyr¹⁹⁹), PI3K, Phospho-AKT (Thr³⁰⁸), AKT, phospho-AS160 (Thr⁶⁴²), AS160, phospho-AMPK α (Thr¹⁷²), AMPK α , GLUT4, β -actin 항체는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, Na⁺/K⁺-ATPase는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 그 외 출처가 언급되지 않은 시약 및 용매는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

도라지 종자 추출물(PGSE)의 제조

본 연구에 시료로 사용된 도라지 종자는 아람종묘(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 시료 100 g에 1 L의 에탄올을 가한 후 Soxhlet 추출장치를 이용하여 4시간 동안 용매추출을 실시하였으며 회전 증발농축기(EYELA N-1000, Sunil Eyela, Seongnam, Korea)를 이용하여 용매를 제거한 후 추출물을 동결건조(FD8512, Ilshin Bio-Branch, Seoul, Korea)하여 분말 시료를 제조하였다. 준비된 시료는 사용 전까지 -40°C에 보관하였다.

실험동물의 사육

실험동물은 5주령의 수컷 C57BLKS/J-*db/db* mouse (Central Lab. Animal Inc, Seoul, Korea)를 구입하여 일주일간 순응시킨 후 총 3개군으로 대조군(control), 저농도 처리군(PGSE-L, 300 mg/kg, wb), 고농도 처리군(PGSE-H, 600 mg/kg, wb; n=8)으로 배치하여 8주간 동물사육 실험을 진행하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 22±1°C, 습도 50±10%를 유지하였으며, 명주기와 암주기를 12시간 간격으로 조절하였다. 시료는 PBS buffer에 용해 후 매일 오전 10시 동일한 시각에 zonde를 이용하여 경구투여 하였으며, 대조군의 경우 동량의 PBS buffer를 투여하였다. 실험기간 동안 식이(일반사료, Teklad 2018S, Envigo, UK)와 물은 제한 없이 섭취하도록 하였으며 체중과 사료섭취량은 매주 일정한 시간에 기록하였다. 동물실험은 국민대학교 동물실험윤리위원회(KMU-2018-1)의 승인을 받아 본교 표준작업지침서에 따라 수행되었다.

혈액, 장기 채취 및 혈청생화학 지표 분석

사육기간의 종료 시점에, 실험동물을 6시간 절식시키고 isoflurane (Hana Pharm, 5 mg/kg, wb)으로 마취한 후 안와채혈을 통해 전혈을 채취하였다. 전혈을 30분간 얼음에 보관 후, 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며 분석 시까지 -80°C에 보관하였다. 혈당, 중성지방, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)과 low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), creatinine의 농도를 혈액분석기를 이용하여 측정하였다. 채혈 후 실험 동물의 간(liver), 부고환지방(epididymal fat

pad), 대퇴근(femoral muscle), 신장(kidney)을 채취하였으며, 간과 신장의 무게를 측정하고, 즉시 액체질소로 동결시킨 후 -70°C에 보관하였다.

당화혈색소 측정

분리된 혈청으로부터 혈당 조절의 중요한 바이오마커인 당화혈색소[hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c})]의 농도는 Hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) ELISA Kit (BioVision)를 이용하여 제조사의 제시 방법에 따라 측정하였다.

혈청 insulin 및 leptin 분석

혈청 내에 insulin과 leptin의 농도는 ultra sensitive mouse insulin ELISA kit (Crystal Chem. Inc.)와 mouse leptin ELISA kit (Crystal Chem. Inc.)를 이용하여 제조사가 제공한 방법으로 측정하였다.

경구 포도당 부하 검사(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)

동물실험 8주차 마지막 날에 쥐를 6시간 동안 절식시킨 후 2 g/kg의 glucose를 경구투여하고 0, 15, 30, 60, 120, 180분의 혈당을 측정하여 경구 포도당 부하 검사를 진행하였다. 채혈은 꼬리 정맥으로부터 혈당측정기(GlucoDr. Plus, AGM-3000, Allmedicus, Anyang, Korea)를 이용하여 실시하였다. 내당능 검사에 따른 혈당 반응 면적(AUC; area under the curve)은 Pruessner 등(2003)의 공식을 이용하여 계산하였다.

간 조직의 중성지방 분석

간 조직의 지방은 Park 등(2019)의 방법으로 추출하였다. 간 조직 100 mg에 5% NP-40을 200 μ L 첨가하여 bullet blender (BBY24M, NEXT ADVANCE, Troy, NY, USA)로 분쇄하고 rotator를 이용하여 50분 동안 4°C에서 유지하였다. 이후 4°C에서 15분간 원심분리(28,500×g)하여 다시 1분간 분쇄하고 95°C에서 5분간 끓이는 작업을 2회 반복하였다. 다시 상온에서 냉각 후 24에서 10분간 원심분리(14,200×g)하여 상등액을 분리하였으며 triglyceride 분석 kit (Wako Chemicals, Osaka, Japan)를 이용하여 중성지방 함량을 정량하였다.

간 조직 글리코겐 함량 분석

간 조직의 글리코겐은 Hassid와 Abraham(1957)의 방법으로 분석하였다. 간 조직 5 mg에 1 mL의 30% potassium hydroxide를 첨가한 후 항온수조에서 100°C로 30분간 가열하고 냉각하였다. 이후 1.25 mL의 95% 에탄올을 첨가하고 가열, 냉각, 원심분리 과정을 통하여 pellet을 회수하여 10 mL의 0.2% anthrone (Sigma Aldrich) 시약을 함유한 95% sulfuric acid (Daejung Chemicals & Metals)를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열 후 얼음에 냉각시킨 후 즉시 680 nm에서 흡광도를 측정하였으며 글리코겐 함량은 D-glucose (Sigma Aldrich)의 표준곡선으로부터 계산하였다.

Western blotting

대퇴근(femoral muscle)에 protein inhibitor와 phosphatase inhibitor가 포함된 RIPA buffer (ATTO)를 첨가한 후 bullet blender (BBY24M, NEXT ADVANCE)로 분쇄하고 원심분리 (1,500×g)하여 15분간 단백질을 추출하였으며 Bradford 방법(1976)으로 상정액의 조직 단백질 농도를 측정하였다. Western blot은 Yoon 등(2018)의 방법으로 다음과 같이 진행하였다. 동일한 양

의 총 세포 단백질을 새로 제조된 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에서 분리한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)에 0.2 A로 90분 동안 옮긴 후 5% BSA를 함유한 TBST 용액에 담가 실온에서 50분간 처리하였다. 이후 4°C에서 5% BSA와 1차 항체(희석비율 1:1,000)를 함유한 TBST 용액으로 하루동안 처리하였고 TBST로 세척한 후 membrane을 적절한 2차 항체(희석비율 1:3,000)를 넣어 1시간 동안 처리한 후 다시 TBST로 세척하였다. 단백질 band는 chemiluminescence detection kit (Bio-Rad)를 사용하여 관찰하였으며 Image Lab software를 사용하여 정량하였다.

세포막 GLUT4 전이 분석

근육 세포막 단백질은 plasma membrane protein extraction kit (Abcam)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. Plasma membrane에서의 GLUT4 발현양은 western blotting으로 분석하였으며, 근육세포막에 존재하는 Na⁺/K⁺-ATPase로 표준화하였다.

통계분석

모든 분석 실험은 3회 반복 실시되었으며 평균±표준편차(SD)로 표현하였다. 통계 분석은 SPSS statistical software (SPSS, version 25, Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였으며, 일원 분산분석에서 유의차가 확인되면 LSD에 의해 각 처리구 간의 유의성을 p<0.05 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

PGSE 처리가 체중, 식이 섭취량, 식이효율에 미치는 효과

PGSE의 투여가 체중변화 및 식이 섭취량, 식이효율에 미치는 효과를 측정할 결과는 Table 1과 같다. 실험의 개시 시에는 대조군과 PGSE 처리군 간에 체중의 차이가 관찰되지 않은 반면, 실험 8주 종료 시 PGSE 고농도 처리군(PGSE-H)은 대조군과 비교하여 체중의 유의적인 감소가 관찰되었다(p<0.05). 식이섭취량의 경우 PGSE 저농도 처리군(PGSE-L)이 대조군과 비교하여 유의적으로 낮았으나(p<0.05) PGSE-H 처리군에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 증체량을 식이섭취량으로 나누어 산출한 식이효율(FER)은 체중변화와 동일하게 고농도 처리군에서 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었고(p<0.05), 따라서 PGSE의 고농도 처리는 대사의 전반적인 개선에 긍정적인 역할을 하는 것으로 생각된다.

Lee 등(2004)에 따르면 db/db 마우스에 도라지 뿌리에 함유되어 있는 성분 중 triterpenoid saponin을 처리한 결과 체중이 감소되었다고 보고하였다. 에탄올 추출에 의한 도라지 종자 및 뿌리 추출물의 조사포닌 함량을 비교한 결과 조사포닌 함량은 각각 360±20, 350±20 µg oleanolic acid equivalent/g extract로 유의적인 차이가 없음을 근거로 할 때 PGSE-H처리군의 체중감소 효과는 PGSE에 포함된 사포닌 함량과 관련이 있을 것으로 추정된다.

PGSE 처리가 간조직의 지방 및 글리코겐 함량에 미치는 효과

동물실험 종료 후 간과 신장의 무게, 간 조직의 중성지방과 글리코겐 함량을 측정할 결과는 Table 2와 같다. 신장 무게에서는 모든 처리군에서 차이를 나타내지 않았으나 간 조직의 무게는 PGSE-H군에서 유의적으로 감소하였으며(p<0.05), 간의 중성지방도 감소하는 경향을 보여 p<0.05 수준에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 p<0.10 수준에서는 유의적인 차이를 나

Table 1. Effect of PGSE administration on body weight, weight gain, food intake, and feed efficiency ratio

	Control	PGSE -L	PGSE-H
Body weight (g)			
Initial	21.48±2.38	21.15±1.59	21.56±0.79
Final	43.40±3.23 ^a	38.95±4.01 ^{ab}	37.73±3.75 ^b
Weight gain (g/week)	2.18±0.46 ^a	1.75±0.41 ^b	1.80±0.13 ^{ab}
Food intake (g/week)	45.86±5.02 ^a	40.48±5.91 ^b	43.16±4.75 ^{ab}
Food efficiency ratio	4.80±0.53 ^a	4.41±0.68 ^{ab}	4.21±0.46 ^b

Control, normal diet; PGSE-L, normal diet+300 mg/kg; PGSE-H, normal diet+600 mg/kg. The values with different superscripts in the same raw indicate significant difference at p<0.05.

Table 2. Effect of PGSE administration on liver and kidney weight, hepatic triglycerides and hepatic glycogen content

Organic weight (g)	Control	PGSE-L	PGSE-H
Liver	1.97±0.25 ^a	1.73±0.26 ^{ab}	1.65±0.15 ^b
Kidney	0.35±0.03	0.32±0.03	0.32±0.22
Liver triglyceride (mg/g liver)	17.54±8.55	16.99±7.72	14.57±3.63
Liver glycogen contents (mg/g wet tissue)	40.16±21.70 ^a	11.95±4.71 ^b	9.72±2.01 ^b

Control, normal diet; PGSE-L, normal diet+300 mg/kg; PGSE-H, normal diet+600 mg/kg. The values with different superscripts in the same raw indicate significant difference at p<0.05.

타냈다. 또한, 간 조직의 글리코겐 함량은 대조군과 비교하여 PGSE-L군과 PGSE-H군에서 모두 유의적인 감소 효과를 나타냈다(p<0.05).

당뇨병에서의 간 지질 축적은 인슐린 저항성과 높은 상관관계를 나타내며(Katsanos, 2004), 간 조직 내 지방 축적은 간으로 순환하는 유리지방산의 공급 증가뿐만 아니라 증가된 내인성 지방산 합성을 통해 일어난다(Brownin과 Horton, 2004). 인슐린은 지방조직에 저장되어있는 포도당의 이용과 triglyceride 생합성을 자극하며 인슐린 저항성의 개선은 지방 조직에서 유리지방산 방출을 억제하고 고중성지방혈증을 개선한다(Iwasa 등, 2010). 따라서, PGSE 고농도 처리군에서 나타난 간 조직 내 triglyceride 감소(p<0.05)는 인슐린 저항성의 개선 효과와 관련이 있을 수 있다.

PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)는 간의 gluconeogenesis에 관여하는 주요 효소로 증가된 간 포도당 생성은 제2형 당뇨병에서 공복 중 고혈당증의 주된 원인으로 알려져 있다(Defronzo 등, 1989). 일반적으로 간에서 과도한 글리코겐의 축적은 당뇨병 환자와 db/db 마우스에서 확인되었으며(Seo 등, 2008), 고지방 식이를 먹인 C57BLKS/6J 마우스에 도라지 뿌리를 12주간 처리한 결과 체중과 간 무게, 간의 TG가 유의적으로 감소하였고 또한 PEPCK의 유의적인 감소 효과를 나타냈다고 보고하였다(Kim 등, 2016). Park 등(2013)에 따르면 db/db 마우스에 감귤 껍질 추출물을 처리하였을 때 체중과 간 무게, 간 글리코겐 함량을 상당히 낮췄으며 이러한 원인은 PEPCK 활성 억제를 통해 glycogen 생성 전구체로부터 글리코겐 합성이 감소하기 때문이라고 하였다(Park 등, 2013). 또한, 간의 과도한 글리코겐 함량 증가는 당뇨병 환자에서 간 비대를 유발한다고 보고되었다(Abaci 등, 2008).

Table 3. Effect of PGSE administration on serum biochemical markers

	Control	PGSE-L (300 mg/kg)	PGSE-H (600 mg/kg)
BUN (mg/dL)	40.00±3.70	42.00±3.92	43.00±4.86
Creatinine (mg/dL)	0.16±0.08	0.20±0.03	0.14±0.09
Glucose (mg/dL)	804.00±127.33	767.00±110.09	779.00±98.09
TG (mg/dL)	233.00±52.83 ^a	159.00±29.44 ^b	179.00±44.49 ^b
Cholesterol (mg/dL)	138.00±16.07	132.00±40.71	122.00±31.45
AST (U/L)	145.00±33.46 ^b	253.00±103.40 ^a	140.00±43.72 ^b
ALT (U/L)	166.00±57.61 ^{ab}	212.00±82.46 ^a	128.00±64.38 ^b
LDL-C (mg/dL)	14.00±6.68	11.00±4.28	11.00±2.98
HDL-C (mg/dL)	79.00±18.33	89.00±41.03	75.00±33.42
Leptin (ng/mL)	38.74±8.86 ^a	32.74±4.86 ^a	23.99±5.65 ^b
Insulin (ng/mL)	0.91±0.20 ^a	0.64±0.62 ^{ab}	0.27±0.10 ^b
Hemoglobin A1c (ng/mL)	86.69±27.18 ^a	76.56±31.09 ^{ab}	48.50±19.20 ^b

The values with different superscript in the same raw indicate significant difference at $p < 0.05$.

BUN, Blood Urea Nitrogen; TG, Triglyceride; AST, Aspartate Aminotransferase; ALT, Alanine Aminotransferase; LDL-C, Low-density Lipoprotein Cholesterol; HDL-C, High-density Lipoprotein Cholesterol.

본 연구에서는 PGSE를 경구 투여 시 간 조직 내 중성지방과 글리코겐 함량을 감소시키는 효과를 나타냈으며, 이러한 효과는 인슐린 저항성의 개선에 긍정적으로 작용할 수 있을 것으로 판단된다.

PGSE 처리에 의한 db/db 마우스의 혈청 생화학적 지표 변화

PGSE의 투여 후 실험동물의 혈청생화학적 지표를 분석한 결과는 Table 3과 같다. 혈당, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤의 경우 대조군과 비교하여 시료 처리군 모두에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며, PGSE 저농도 처리군에서 대조군과 비교하여 혈청 중성 지방의 유의적인 감소효과가 나타났다. 한편, 혈청에서 신장 독성 지표인 BUN, creatinine과 간 독성 지표인 AST, ALT를 측정된 결과 신장 독성 지표의 경우 대조군과 비교하여 시료 저농도 처리군(PGSE-L)에서 유의적으로 증가하였으나 표준편차가 크고, 고농도 처리군(PGSE-H)에서 유의적인 변화가 확인되지 않았음을 고려할 때 시료의 투여로 인한 독성은 문제가 없는 것으로 판단된다.

PGSE의 투여가 제2형 당뇨 동물모델의 당화혈색소를 측정된 결과 db/db 마우스에서의 혈청 내 HbA_{1c} 수준은 PGSE-L군에서 76.56±31.09 ng/mL로 86±27 ng/mL인 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 PGSE-H군의 경우 49±19 ng/mL로 대조군과 비교하여 유의적인 감소 효과를 나타냈다($p < 0.05$). Zhang 등(2011)은 HbA_{1c}는 고혈당증의 중증도에 중요한 바이오 마커로 HbA_{1c} 수준은 적혈구의 수명 동안 누적된 당화 정도를 반영하기 때문에 전체 혈당 조절의 유용한 척도로 사용된다고 보고하였다.

제2형 당뇨병에 있어서 혈중 인슐린 농도 측정은 인슐린 민감성 및 저항성을 측정할 수 있는 중요한 표지이다. 제2형 당뇨병 동물 모델에서 PGSE의 투여가 실험동물의 인슐린 및 렙틴 수준에 미치는 효과를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 혈청 내 인슐린 수준을 분석한 결과 PGSE-L군은 0.64±0.62 ng/mL로 0.91±0.2 ng/mL인 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았으나 PGSE-H군은 0.27±0.1 ng/mL로 대조군과 비교하여 유의적인 감소효과를 나타냈다($p < 0.05$). 일반적으로 인슐린저항성과 고인슐린 혈증은 비만과 밀접한 관련이 있으며 지방조직으로부터 방출된 유리지방산이 제2형 당뇨병과 연관되어 있다(Weyer 등, 2001). 정상인의 경우 말초조직으로부터 흡수된 포도당은 인슐린 작용을

통해 포도당의 이용을 자극하고 글리코겐 합성을 활성화시킨다(Kim 등, 2009). 일반적으로 인슐린 저항성 상태에서도 인슐린의 작용이 모두 감소하는 것이 아니며, 간에서의 지방산 신합성과 같은 기능은 저하되지 않고 인슐린저항성에 동반되는 고인슐린 혈증에 의해 증가된다고 알려져 있다(Choi, 2009). 따라서, 대조군의 높은 혈중 인슐린 농도는 인슐린 저항성과 인슐린 매개 포도당 흡수가 저해되고 있음을 의미하며, PGSE 고농도처리군(PGSE-H)에서 나타난 유의적인 혈당 감소 및 인슐린 농도 저하는 인슐린 저항성이 개선됨으로써 감소효과를 나타낸다는 이전의 연구결과와 유사하였다(Guo 등, 2012).

PGSE처리가 혈청내 렙틴 수준에 미치는 영향을 분석한 결과 렙틴 수준은 38.74±8.86 ng/mL인 대조군과 비교하여 PGSE-L군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 PGSE-H군에서 23.99±5.65 ng/mL로 유의적으로 감소하였다(Table 3). Sainz 등(2015)은 설치류와 사람에서 tumor necrosis factor alpha (TNF- α)와 Interleukin 1 β (IL-1 β)와 같은 염증성 cytokine이 혈청 렙틴 농도를 증가시킨다고 보고하였다(Sainz 등, 2015). 이는 PGSE처리가 염증의 억제효과에서 확인된 것과 같이 염증성 cytokine을 감소시킴으로써 렙틴저항성을 개선하는데 기여할 가능성을 나타낸다. 또한 고렙틴혈증은 제2형 당뇨 질환 환자와 비만인 사람에서 혈중 내 높은 농도로 존재한다고 알려져 있다(Kusakabe 등, 2009). 따라서, 연구결과는 혈중 인슐린 농도와 렙틴 농도가 상관성을 보이고 있음을 나타내며 렙틴이 고인슐린혈증과 인슐린 저항성에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

본 연구에서 PGSE의 처리는 대조군과 비교하여 혈청 내 포도당 농도가 PGSE-L, PGSE-H 군 모두에서 감소하였지만 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그 정확한 이유는 확인할 수 없으나 PGSE의 혈당 조절 기작은 식이 내 포함된 당의 흡수를 억제하는 α -glucosidase 억제효과와 관련이 있을 것으로 판단된다. 본 연구의 선행연구로 진행된 Yoon 등(2018)의 연구에서도 PGSE가 α -glucosidase 활성을 억제시키고 palmitic acid으로 인슐린 저항성을 유도한 C2C12세포에서 포도당의 흡수를 증가시키는 결과를 나타냈다.

PGSE 처리가 db/db 마우스의 경구 포도당 부하(OGTT)에 미치는 효과

PGSE 시료 투여 8 주차에 OGTT를 실시한 결과는 Fig. 1과 같

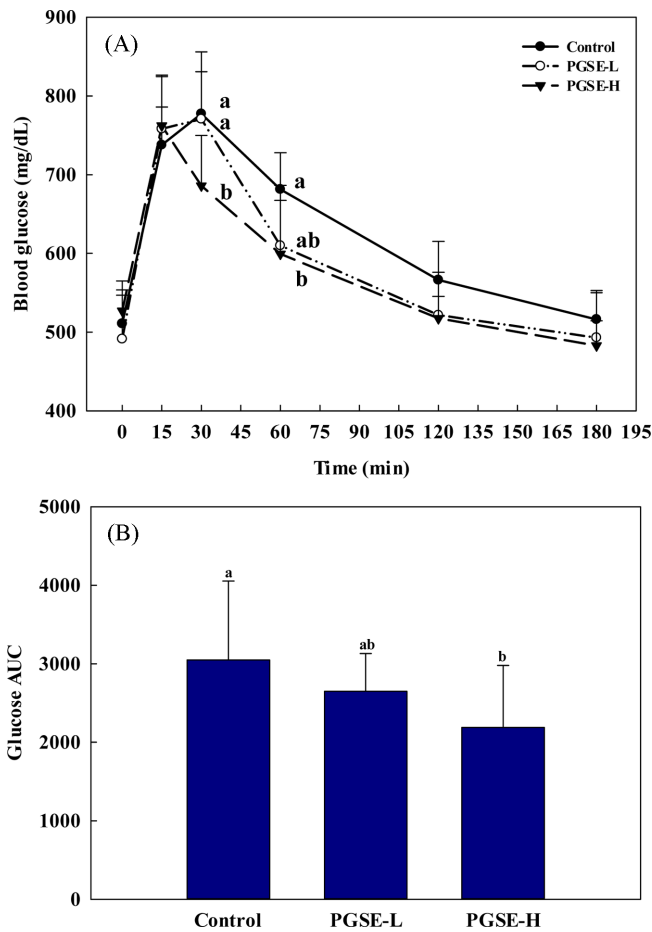


Fig. 1. Effect of PGSE administration on OGTT (A) and its area under the curve (AUC) (B) in db/db mice. The values with different letters indicate significant difference at $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SD.

다. 포도당 투여 30분 후 대조군과 PGSE-L군의 각각 777 \pm 53, 770 \pm 85 mg/dL로 가장 높은 혈당치를 나타낸 반면, PGSE-H군에서는 15분 혈당이 762 \pm 62 mg/dL로 가장 높았으며 또한 30분과 60분 혈당에서 대조군과 비교하여 유의적인 감소 효과가 나타났다($p < 0.05$). 또한, OGTT에 대한 곡선하면적(area under the curve)를 계산한 결과 대조군과 비교하여 PGSE-L군에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, PGSE-H군에서는 대조군과 비교하여 유의적인 감소 효과를 확인하였다.

특히 경구 당부하 시험에서 고혈당이 나타날 경우 포도당 내성 손상(IGT, impaired glucose tolerance), 공복 포도당 손상(IFG, impaired fasting glucose)을 의심할 수 있고 임신이 아닌 경우 IFG와 IGT는 그 자체로 당뇨병과 심혈관 질환의 위험요소로 간주된다(Fuller 등, 1980). IFG와 IGT는 인슐린 저항성과의 상관관계가 있고 낮은 HDL 수준과 고혈압과 같은 심혈관 위험요소를 포함하며 또한 고중성지방혈증을 포함하는 지표라 볼 수 있다(American Diabetes Association, 2003).

Bansal 등(2012)은 STZ mice에 *Pilea microphylla* L. 플라보노이드 분획을 투여한 후 OGTT를 측정한 결과 600, 900 mg/kg 투여 그룹에서 대조군과 비교하여 유의적으로 혈당이 감소하는 것을 확인하였으며 따라서 포도당 내성이 개선된 것이라고 보고하였다. Kim 등(2000)은 *platycodon grandiflorum* 뿌리추출물을 zucker rat에 4주간 투여한 결과 OGTT에서 포도당 경구투여 30

분 후 혈중 포도당 수준의 현저한 감소를 초래했다고 보고하였다. 또한, Zang 등(2016)은 PGSE의 유효성분으로 알려진 luteolin을 KK-Ay 마우스에 4주간 처리한 결과 OGTT에서 유의적인 혈당 감소 효과가 관찰되었다고 보고하였다. 이상의 결과는 제2형 당뇨병 동물모델에서의 PGSE 투여는 고농도 처리시 식후 혈당 감소에 효과를 보인다고 볼 수 있다.

제2형 당뇨병 동물모델에서 PGSE 투여가 인슐린 의존성 경로 활성화에 미치는 영향

골격근에서 포도당 흡수는 인슐린 의존성 경로인 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)의 인산화에 의해 시작되고 phosphoinositide 3 kinase (PI3K)의 순차적인 산화를 통하여 궁극적으로 세포질에서 세포막으로 포도당 수송체인 GLUT4 전이(translocation)를 일으킨다. 또한, AMP-activated protein kinase (AMPK)에 의하여 인슐린 비의존성 포도당 흡수가 일어나기도 한다(Jessen과 Goodyear, 2005).

제2형 당뇨병 동물모델 db/db 마우스 골격근에서 PGSE 처리에 의한 포도당 흡수 촉진 효과를 확인하기 위하여 IRS-1/PI3K/AKT, AS160의 인산화 정도를 western blotting을 통하여 분석하였다. PGSE-H군에서 IRS-1과 PI3K 인산화는 대조군과 비교하여 각각 1.2배, 1.4배 증가하였으며 IRS-1/PI3K/AKT 경로의 마지막 단계인 AKT 인산화 수준은 PGSE-H 군에서 대조군과 비교하여 약 1.6배 증가하였으며 AKT의 하위 인자인 AS160 인산화 수준도 약 2.3배 증가하였다(Fig. 2).

Yoon 등(2018)은 palmitic acid를 이용하여 인슐린저항성을 유도한 C2C12 근육 세포 모델에서 PGSE의 처리는 유의적으로 인슐린의존성 포도당 흡수 세포신호전달을 촉진시켰다고 보고하였으며, PGSE에 존재하는 luteolin이 포도당 흡수 세포신호전달을 촉진하는 대표적 유효 성분이라고 보고하였다. Xu 등(2014)은 저용량(0.002% in high fat diet) luteolin 처리가 mast cell recruitment와 adipocyte 염증을 감소시킴으로써 마우스에서 식이에 의하여 유발되는 비만과 인슐린 저항성을 현저하게 감소시켰다고 보고하였다. 또한, luteolin 처리는 streptozotocin 유도 당뇨병 마우스에서의 IRS-1/PI3K/AKT 경로의 세포 신호전달을 회복시켰다고 보고하였다(Chen 등, 2016).

이상의 결과는 PGSE 처리가 근육세포 모델의 경우와 유사하게 제2형 당뇨병 모델에서도 인슐린 저항성을 개선함으로써 인슐린 의존성 경로에 의한 포도당 흡수를 촉진하는 것을 의미한다.

제2형 당뇨병 동물모델에서 PGSE의 투여가 AMPK 발현에 미치는 영향

PGSE의 투여가 인슐린 비의존성 포도당 흡수 촉진과 관련된 AMPK 활성화와 GLUT4 막 전이에 미치는 효과를 western blotting을 이용하여 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. PGSE 고농도 처리는 AMPK 인산화와 골격근 GLUT4 세포막 전이를 대조군 대비 각각 1.5배와 1.7배 증가시켰다.

인슐린 의존성 신호 경로와 인슐린 비의존성 경로는 모두 골격근에서 포도당 수송체인 GLUT4의 전사 또는 번역과는 독립적으로 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시킨다고 알려져 있으며(Herman과 Kahn, 2006), PGSE는 Yoon 등(2018)의 세포 모델 연구 결과와 동일하게 동물모델에서도 인슐린 의존성, 비의존성 경로 모두를 촉진하는 것으로 나타났다. 이는 Liu 등(2011)의 연구에서 palmitate에 의해 유도된 HepG2 세포모델에서의 luteolin 처리가 AMPK 인산화를 유의적으로 활성화시켰다는 연구결과와 일치하며, 따라서 PGSE의 유효성분인 luteolin으로 인해 세포모

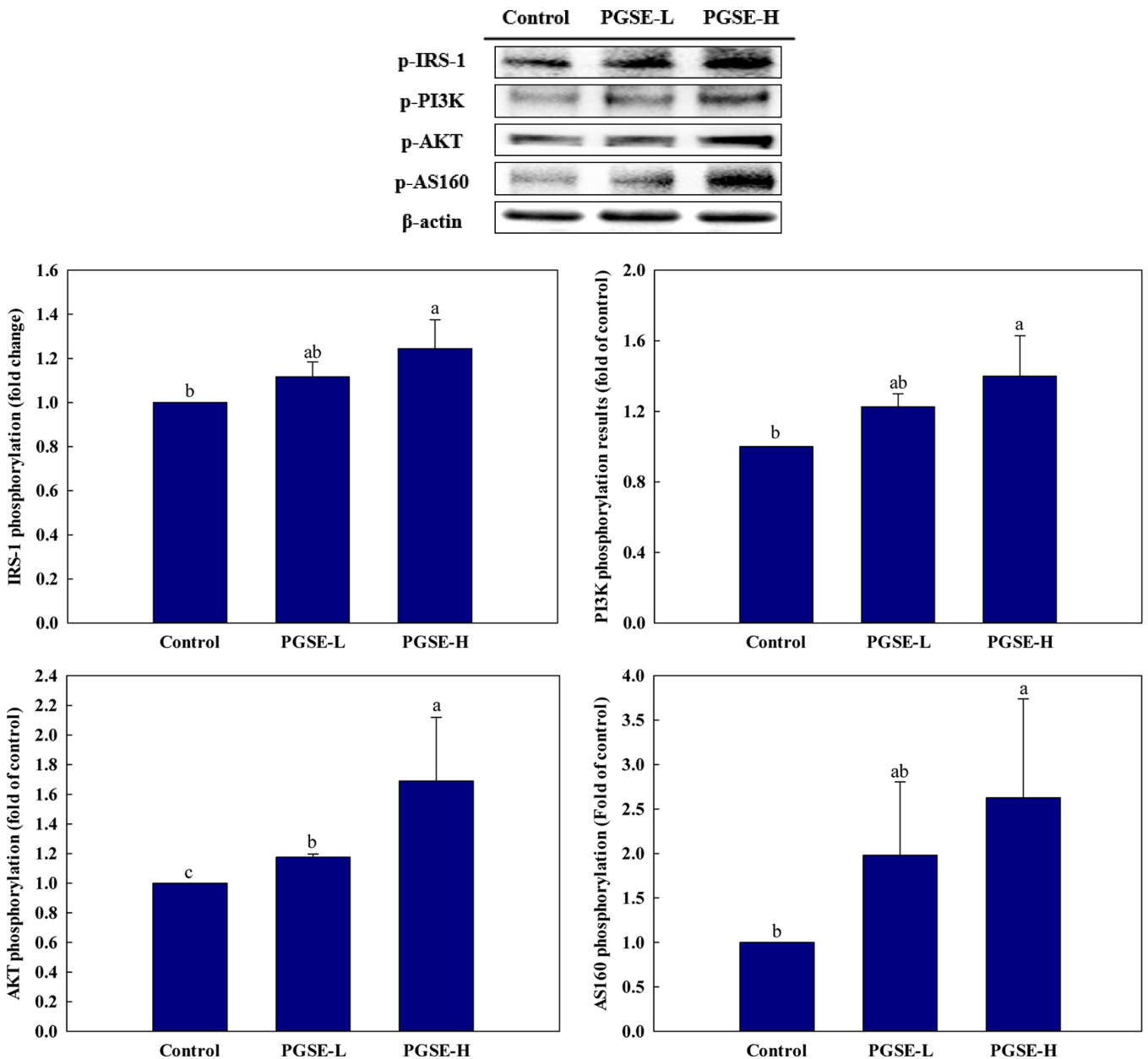


Fig. 2. Effect of PGSE administration on IRS-1, PI3K, AKT, and AS160 phosphorylation in the femoral muscle. The values with different letters indicate significant difference at $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SD.

텔에서와 같이 동물모델에서도 AMPK 인산화가 증가한 것이라 볼 수 있다. 일반적으로 제2형 당뇨병 환자에게 사용되는 것으로 알려진 Metformin은 말초조직에서 AMPK를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Shaw 등, 2005).

요 약

PGSE의 혈당조절 효과를 평가하기 위하여 제2형 당뇨 동물모델을 이용하여 8주간의 동물실험을 진행한 결과, 고농도 PGSE (600 mg/kg)의 투여는 경구 포도당 내성 및 혈당 수준을 유의적으로 감소시켰으며($p < 0.05$), 당화혈색소도 유의적으로 낮은 수준을 유지시켰다($p < 0.05$). 또한, 혈청 인슐린과 렙틴 농도 역시 대조군과 비교하여 PGSE 고농도 처리군에서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). PGSE 투여는 *db/db* 마우스의 골격근에서 인슐린의

존적 세포신호전달경로를 유의적으로 활성화시켰으며, AMPK 인산화를 촉진시키고, 골격근내 포도당 흡수를 위한 GLUT4의 세포막으로의 전이를 대조군 대비 약 1.7배 증가시켰다. 이러한 결과를 근거로 할 때 PGSE는 항 당뇨병 치료제로서의 잠재적 가능성을 가진 것으로 판단된다.

기호 및 용어 설명

- PGSE: *Platycodon grandiflorum* Seed Extract
- OGTT: Oral Glucose Tolerance Test
- IGT: Impaired Glucose Tolerance
- IFG: Impaired Fasting Glucose
- AUC: Area Under the Curve
- HbA_{1c}: Hemoglobin A_{1c}
- AMPK: AMP-Activated Protein Kinase

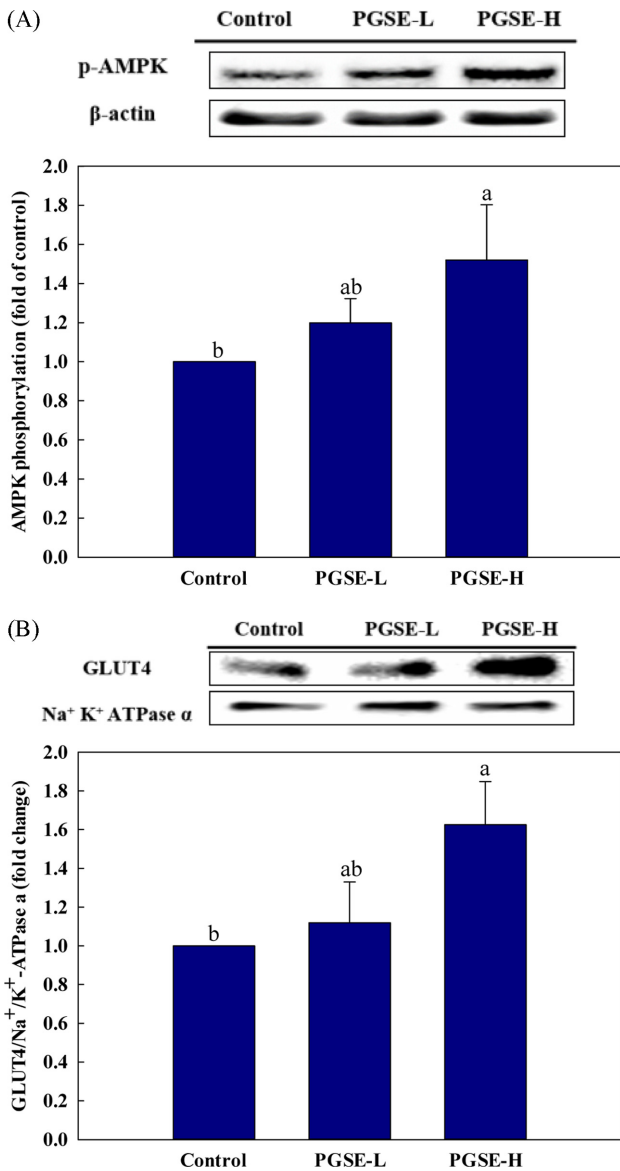


Fig. 3 Effect of PGSE administration on AMPK phosphorylation (A) and GLUT4 translocation (B). The values with different superscript indicate significant difference at $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SD.

IRS-1: Insulin Receptor Substrate 1
 PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase
 AKT: Protein Kinase B
 BUN: Blood Urea Nitrogen
 TG: Triglyceride
 AST: Aspartate Aminotransferase
 ALT: Alanine Aminotransferase
 LDL-C: Low-density Lipoprotein Cholesterol
 HDL-C: High-density Lipoprotein Cholesterol

감사의 글

본 연구는 오투기함태호재단의 연구비 지원(2017-029)을 받아 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

References

Abaci A, Bekem O, Unuvar T, Ozer E, Bober E, Arslan N, Ozturk Y, Buyukgebiz A. Hepatic glycogenesis: a rare cause of hepatomegaly in Type 1 diabetes mellitus. *J. Diabetes Complicat.* 22: 325-328 (2008)

American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: s5-s20 (2003)

Bansal P, Paul P, Mudgal J, Nayak PG, Pannakal ST, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64: 651-658 (2012)

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114: 147-152 (2004)

Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8: 228-236 (2012)

Chen L, Tian G, Tang W, Luo W, Liu P, Ma Z. Protective effect of luteolin on streptozotocin-induced diabetic renal damage in mice via the regulation of RIP140/NF- κ B pathway and insulin signaling pathway. *J. Funct. Foods* 22: 93-100 (2016)

Choi CS. Pathogenesis of insulin resistance. *Korean J. Med.* 77: 171-177 (2009)

DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism.* 38: 387-395 (1989)

El-Gied AAA, Joseph MRP, Mahmoud IM, Abdelkareem AM, Hakami A, Hamid ME. Antimicrobial activities of seed extracts of Mango (*Mangifera indica* L.). *Adv. Microbiol.* 2: 571-576 (2012)

Fuller J, Shipley M, Rose G, Jarrett RJ, Keen H. Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance The Whitehall study. *Lancet* 315: 1373-1376 (1980)

Guo H, Xia, Min, Zou T, Ling W, Zhong R, Zhang W. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and *db/db* mice via the transcription factor FoxO1. *J. Nutr. Biochem.* 23: 349-360 (2012)

Hassid WJ, Abraham S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Method. Enzymol.* 3: 34-50 (1957)

Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J. Clin. Invest.* 116: 1767-1775 (2006)

Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 5: 237-252 (2007)

Iwasa J, Shimizu M, Shiraki M, Shirakami Y, Sakai H, Terakura Y, Takai K, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Dietary supplementation with branched-chain amino acids suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJdb/db mice. *Cancer Sci.* 101: 460-467 (2010)

Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 99: 330-337 (2005)

Katsanos CS. Lipid-induced insulin resistance in the liver. *Sports Med.* 34: 955-965 (2004)

Kim KS, Seo EK, Lee YC, Lee TK, Cho YW, Ezaki O, Kim CH. Effect of dietary *Platycodon grandiflorum* on the improvement of insulin resistance in obese Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.* 11: 420-424 (2000)

Kim MA, Jeong YS, Chun Gei, Taek, Cha YS. Antihyperlipidemic and glyemic control effects of mycelia of *Inonotus obliquus* including protein-bound polysaccharides extract in C57BL/6J mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38:667-673 (2009)

Kim Y, Choi JY, Ryu R, Lee J, Cho SJ, Kwon EY, Lee MK, Liu KH, Rina Y, Sung MK, Choi MS. *Platycodon grandiflorum* root extract attenuates body fat mass, hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue. *Nutrients* 8: 532 (2016)

- Kusakabe T, Tanioka H, Ebihara K, Hirata M, Miyamoto L, Miyanaga F, Hige H, Aotani D, Fujisawa T, Masuzaki H, Hosoda, K, Nakao K. Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. *Diabetologia* 52: 675-683 (2009)
- Lee KJ, Choi CY, Chung YC, Kim YS, Ryu SY, Roh SH, Jeong HG. Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 147: 271-282 (2004)
- Liu JF, Ma Y, Wang Y, Du ZY, Shen JK, Peng HL. Reduction of lipid accumulation in HepG2 cells by luteolin is associated with activation of AMPK and mitigation of oxidative stress. *Phytother. Res.* 25: 588-596 (2011)
- Nyakudya E, Jeong JH, Lee NK, Jeong YS. Platycosides from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their health benefits. *Prev. Nutr. Food Sci.* 19: 59 (2014)
- Park HJ, Jung UJ, Cho SJ, Jung HK, Shim S, Choi MS. *Citrus unshiu* peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose-and lipid-regulating enzymes in *db/db* mice. *J. Nutr. Biochem.* 24: 419-427 (2013)
- Park K, Yoon HJ, Imm JY, Go GW. *Hovenia dulcis* extract attenuates high-fat diet-induced hepatic lipid accumulation and hypertriglyceridemia in C57BL/6 Mice. *J. Med. Food* 22: 74-80 (2019)
- Park SH, Lee WY, Kim SW. The relative risk of metabolic syndrome defined by adult treatment panel III according to insulin resistance in Korean population. *Korean J. Med.* 64: 552-560 (2003)
- Park YS, Yoon Y, Ahn HS. *Platycodon grandiflorum* extract represses upregulated adipocyte fatty acid binding protein triggered by a high fat feeding in obese rats. *World J. Gastroentero.* 13: 3493-3499 (2007)
- Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G, Hellhammer DH. Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrino.* 28: 916-931 (2003)
- Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolis.* 64: 35-46 (2015)
- Seo KI, Choi MS, Jung UJ, Kim HJ, Yeo J, Jeon SM, Lee MK. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic *db/db* mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 995-1004 (2008)
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, DePinho RA, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310: 1642-1646 (2005)
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106: 171-176 (2000)
- Sivaprakasapillai B, Edirisinghe I, Randolph J, Steinberg F, Kappagoda T. Effect of grape seed extract on blood pressure in subjects with the metabolic syndrome. *Metab. Clin. Exp.* 58: 1743-1746 (2009)
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246 (2010)
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 1930-1935 (2001)
- Xu N, Zhang L, Dong J, Zhang X, Chen YG, Bao B, Liu J. Low-dose diet supplement of a natural flavonoid, luteolin, ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 58: 1258-1268 (2014)
- Yoon HJ, Bang MH, Kim H, Imm JY. Improvement of palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells using *Platycodon grandiflorum* seed extracts. *Food Biosci.* 25: 61-67 (2018)
- Zang Y, Igarashi K, Li Y. Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-A y mice. *Biosci. Biotech. Bioch.* 80: 1580-1586 (2016)
- Zhang W, Welihinda A, Mechanic J, Ding H, Zhu L, Lu Y, Deng Z, Sheng Z, Lv B, Chen Y, Roberge JY, Seed B, Wang YX. EGT1442, a potent and selective SGLT2 inhibitor, attenuates blood glucose and HbA1c levels in *db/db* mice and prolongs the survival of stroke-prone rats. *Pharmacol. Res.* 63: 284-293 (2011)