

황백 에탄올 추출물의 혈당강하작용

김옥경[†]

대진대학교 과학기술대학 식품영양학과, 교수
(2020년 7월 10일 접수: 2020년 8월 10일 수정: 2020년 8월 10일 채택)

Antidiabetic Effect of Ethanol Extract on *Phelladindron amurense* Rupr

Ok-Kyung Kim[†]

Department of Food Science and Nutrition, Dae Jin University, Pochon 487-711, Korea
(Received July 10, 2019; Revised August 10, 2019; Accepted August 10, 2020)

요 약 : Streptozotocin(STZ)을 45mg/kg.b.w의 용량으로 흰쥐의 미정맥에 투여 한 후 당뇨병이 유발된 당뇨 흰쥐에게 1일 1회 7일간 1,000mg/kg.b.w의 용량으로 황백에탄올 추출물을 투여 후 glucose 함량과 당대사에 관여하는 효소인 glucose-6-phosphatase(G-6-Pase), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH), glucokinase(GK)활성과 glycogen 함량을 측정된 결과 황백 에탄올 추출물 투여군이 glucose 함량과 G-6-Pase 활성의 유의적인 감소를 나타내었으며 glycogen 함량과 G-6-PDH, GK의 활성은 유의적인 증가를 나타내었다. 이와 같이 황백 에탄올 추출물이 혈당강하 효과를 가졌다.

주제어 : 황백, 에탄올 추출물, 스트렙토조토신, 글루코스함량, 글라이코젠 함량, G-6-pase 활성, G-PDH 활성, G.K 활성, 혈당강하작용

Abstract : This study was performed to investigate the antidiabetic effect of ethanol extract of *Phelladrindron Amurense Rupr* (P.A) in Streptozotocin(STZ) induced diabetic rats. Diabetes was induced by intravenous injection of STZ at a dose of 45mg/kg,b.w. dissolved in citrate buffer. The ethanol extract of P. A was orally administrated once a day for 7 days at a dose of 1,000mg/kg. The content of serum glucose, was significantly decreased in P.A treated group compared to the those of STZ-control group. The content of hepatic glycogen and activities of glucokinase(GK) and glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH) were significantly increased($p < 0.05$), and activity of glucose-6-phosphatase(G-6-Pase) was significantly decreased($p < 0.05$) in P.A treated group compared to those of STZ-control group, These results indicated that ethanol extract of P.A have antidiabetic effect in STZ-induced diabetic rats.

Keywords : *Phelladrindron Amurense Rupr*(P.A), ethanol extract, streptozotocin, glucose-6-phosphatase(G-6-Pase), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH), glucokinase (GK), antidiabetic effects

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

1. 서론

많은 시설과 장비의 자동화 또는 원격화와 스마트기기의 사용이 증가되면서 육체적 활동의 감소와 서구화된 식습관 및 외식의 증가로 생활 습관병이 점점 증가되고 있다. 특히 당뇨병은 통계청 발표 2018년 10대 사인중의 하나로 자리매김하고 있다. 당뇨병은 췌장에 있는 Langerhans islets의 β -세포에서 분비되는 insulin의 절대적 또는 상대적 분비부족으로 혈중 glucose 농도가 급격하게 상승하여 체내에 비정상적인 당질 대사를 초래하는 질병이다. 따라서 당뇨병에 대한 적절한 치료와 예방이 이루어지지 않는다면 혈관장애 뿐만 아니라 신증, 신경변증, 망막변증, 백내장과 같은 심각한 합병증을 야기 하기도 한다 [1]. 최근에는 식품의 기능성이라는 과제가 대두되면서 특히 식물성 물질에 포함되어 있는 phytochemical 물질이 여러 가지 질병을 억제하는 것으로서 활발한 연구가 진행되고 있다. 본 실험에 사용한 황백은 운향과에 속하는 황백나무의 주피를 벗겨낸 줄기껍질을 말린 것으로 한방에서는 염증, 폐렴, 감기, 소염약으로 쓰이며 생리활성 연구로는 이등[2]이 황백으로부터 멜라닌 생합성 억제에 관한 연구와 이등[3]이 helicobacter pylori에 대한 항균활성에 대한 연구 등이 보고되었다. 특히 가미육미지황탕의 한 성분으로 동물실험결과 혈당저하 작용을 김등[4], 허등[5], 곽등[6], 이등[7], 박등[8]이 보고 하였다. 황백의 주요화합성분은 berberine, palmatine, jatrorrhizin등의 alkaloids와 limonin, obnucunone 등의 고미성 물질과 steroid등이 있다. 이중에서 triterpenoid lactone인 limonin은 hypoglycemic activity가 있음이 보고 되었다. 따라서, 본 실험에서는 예비실험 결과 혈당강하 작용이 있었던 황백의 95% 에탄올 추출물이 혈당강하 작용에 관여하는 몇몇 효소인 Glucose-6-phosphatase (Glucose-6-Pase), Glucose-6-phosphate dehydrogenase(Glucose-6-PDH), Glucokinase (GK)를 측정하여 혈당강하 작용을 갖는 기능성 식품개발에 기여할 수 있는 기초적인 자료를 얻고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시료, 시약 및 기기

본 실험에 사용한 건조된 황백은 서울경동 약령시장(강원도 산)에서 구입하였으며 시약 및 기기는 Kim[9]의 방법에 따라 사용하였다. 즉, 시약은 streptozotocin (STZ), sodium azide, glutathione, glutathione reductase, NADPH, cumene hydroperoxide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), xanthine, xanthine oxidase, cytochrome C, sodium deoxycholate, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, thiobarbituric acid, amyloglucosidase, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, cacodylate, ascorbic acid, glycylglycine, tris-HCl, NAD, ATP, bovine serum albumin 등은 (Sigma Co., U.S.A.)을 사용하였으며, glucosekit는 영동제약의 것을 사용하였고, 나머지 기타 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

기기는 Rotary vaccum evaporator (Eyela Co., Japan), Deep freezer (Hannil Co., Korea), Centrifuge (Hannil Co., Korea), UV spectrometer (Kontron 927, Italy)를 사용하였다.

2.2. 추출 실험

구입한 황백(600 g)을 환류냉각기가 달린 추출병에 넣고 황백이 잠길 정도로 95% 에탄올을 넣고 95 °C의 water bath에서 4시간씩 3번 가열 추출한 후 여액을 진공농축기에서 감압농축하였다.

2.3. 실험동물사육, 당뇨유발 및 검역의 조제

Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐(rat)를 (주) 오리엔트 바이오에서 구입하였으며, 동물실험은 2015년 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 재승인을 받아(심의번호:2015-05) 행하였으며 일주일간 고형사료((주) 삼양사)를 먹여 사육장 환경에 적응시킨 후 210 g \pm 15 g의 흰쥐를 하룻밤 동안 절식시킨 후 췌장의 β -cell에만 선택적으로 작용하여 당뇨를 유발하는 Streptozotocin(STZ)을 45 mg/kg,b.w 용량으로 0.01M citric acid buffer(pH 4.5)에 녹여 2 ml/kg,b.w 용량으로 미정맥 주사를 하였다. STZ 주사 48시간이 경과한 후 안와정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈당이 300 mg/dl 이상인 것을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 5마리씩 당뇨 유발 대조군(STZ-Control), 당뇨 유발 실험군(STZ-Sample)으로

나누었으며 정상 군과 당뇨유발 대조군은 0.5% CMC를, 당뇨 유발 실험군에는 황백에탄올 추출물을 1,000mg/kg, b.w.의 용량으로 0.5% CMC 용액에 현탁시켜 10 ml/kg, b.w.씩 1일 1회 7일간 경구투여 하였다.

2.4. 효소원 조제 및 분석

혈청중의 glucose 함량과 간조직 중의 glycogen함량과 당대사를 위한 glucose-6-phosphatase(G-6-pase), glucose-6 phosphate dehydrogenase(G-6-PDH), glucokinase(GK) 측정은 Kim[9]과 같은 방법으로 측정하였다.

즉 glycogen함량과 당대사를 위한 효소원 처리는 간 2g을 0.1M ice-cold citrate buffer(pH4.2) 6ml를 넣어 균질화시킨 후 3,000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액에서 glycogen함량, glucose-6-phosphatase(G-6-pase), glucose-6 phosphate dehydrogenase(G-6-PDH)활성을 측정하였고, glucokinase(GK)측정은 간2g을 1mM EDTA가 혼합된 buffer 6ml에 넣어 균질화 시킨 다음, 12,000xg에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 취하여 측정하였다.

2.5. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. Ethanol 추출물의 수율

건조시킨 황백 600 g을 95% 에탄올로 4시간씩 3번 가열추출한 후 여액을 감압농축한 결과 95 g (수율15.8%)의 추출물을 얻었다.

3.2. 혈당 저하 효과

혈청내의 혈당저하 효과는 Table 1과 같다. 정상군의 혈당치가 132.57±5.06 mg/dl에 비해 당뇨대조군은 483.84±21.27 mg/dl로 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 Williamson등[10]이 STZ투여 1~3일 후에 현저한 고혈당과 hypoinsulinemia는 간장의 인슐린 저항으로 당의 이용 감소를 나타내고, 상승된 혈당수준은 vascular oxidation 대사의 이상을 초래하며 산소가 불완전하게 산화되어 생성된 유리기의 활성화로 β-세포의 자동면역기능이 파괴되어 당뇨증상을 보이게 된다고 보고하였다. 그러나 황백 추출물 투여군에서 218.76±28.08 mg/dl로 유의적인 감소를 나타내었다. 이는 Manuel 등[11], Yan 등[12], Sumio 등[13]의 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

3.3. 간 조직중의 Glycogen 함량

STZ에 의해 당뇨가 유발된 쥐에서는 glycogen synthase phosphatase활성의 감소[14]와 췌장의 β-세포 파괴에 의한 인슐린 분비 부족으로 glycogen phosphorylase가 활성화되어 glycogen

Table 1. The Serum Glucose Level of Normal and Diabetic Rats Fed by ethanol Extract of *Phelladidron amurens Rupr*

Experimental group	Dose (mg/kg, b.w, p.o)	Glucose(mg/dl)
Normal	-	132.57±5.06 ¹⁾
STZ ²⁾ -control	-	483.84±21.27 [#]
STZ-P.A ³⁾	1,0000	218.76±28.08 [*]

¹⁾Values are the mean±S.E.(n=5)

²⁾Streptozotocin(45 mg/kg, b.w) [0.01M citric acid buffer(pH4.5)] was intraperitoneal(i.p) injected into the tail vein. [#]Significant difference from normal at p<0.05, ^{*}Significant difference from STZ-control at p<0.05 by student's t-test.

³⁾The ethanol extract of *Phelladidron amurens Rupr.*(P.A) was administrated orally once a day in experimental rats for 7 days.

Table 2. The Content of Hepatic Glycogen of Normal and Diabetic Rats Fed by Ethanol Extract of *Phelladidron amurens Rupr*

Experimental group	Dose (mg/kg, b.w, p.o)	Glycogen (mg/g)
Normal	-	102.37±9.02 ¹⁾
STZ ²⁾ -control	-	61.32±8.39 [#]
STZ + P.A ³⁾	1000	95.43±10.19 [*]

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

분해가 증대되어 간의 glycogen 함량이 감소한다는 meglasson 등의 보고[14]에 따라 간내의 glycogen 함량은 Table 2과 같이 정상군의 조직 내 102.37±9.02 mg/g 와 비교하여 당뇨대조군에서 61.32±8.39 mg/g 로 감소를 나타내었다. 그러나 황백 에탄올 추출물 투여 군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 혈당저하 실험에서 황백 에탄올 추출물 투여군에서 유의적인 혈당저하 효과가 간의 glycogen 함량을 증가시킨 것으로 사료된다.

3.4. 간 조직중의 Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 활성

간 조직에서 glucose-6-phosphate를 glucose로 합성시 촉매반응에 관여하는 당신생합성과정의 첫 번째 효소인 G-6-pase 활성은 Table 3와 같다. 정상군이 이 3.52±0.03 nmol/mg protein/min 인 것에 비하여 당뇨대조군은 4.13±0.02nmol/mg protein/min로 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 당뇨동물에서 고혈당 현상과 함께 혈장의 protein kinase 활성도와 insulin농도는 감소하였으나 G-6-pase 활성도는 증가하였다는 Ghosh 등의 보고[15]와 유사하였다. 본 실험결과 황백 에탄올 추출물 투여군에서 유의적인 감소를 나타내었다.

3.5. 간 조직중의 Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH)활성

G-6-PDH의 활성은 Table 3와 같다. 정상군이 0.15±0.03 unit/mg protein/min인 것에 비하여 당뇨대조군은 0.08±0.02 unit/mg protein/min로 감소를 나타내었다. G-6-PDH는 체내의 모든 세포에 존재하며 glucose 대사 과정

의 pentose phosphate pathway로 들어가는 최초의 과정에 관여하는 효소이며, 또한 GSH-Px가 GSSG를 GSH로 환원시키는데 필요한 NADPH를 생성하는 효소(Himeno [16]로서, STZ 투여에 의해 당뇨가 유발된 군은 G-6-PDH의 효소활성 감소에 따라 ribose-5-phosphate와 NADPH의 생성감소를 유발하며 이러한 일련의 대 사변화는 당뇨 유발시 환원력의 감소로 인한 세포막의 구조변화와 여러 세내 내 소기관의 구조변형을 유발시키며 세포의 증식 및 성장의 감소에 영향을 미친다. 본 실험 결과, 황백 에탄올 추출물 투여군에서 당뇨대조군과 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다.

3.6. 간 조직중의 Glucokinase(GK) 활성

해당 작용의 첫 단계 주요조절 효소인 glucokinase는 hexokinase group의 isozyme들 중 하나로서 간세포와 췌장의 β-세포에만 존재하며 두 조직의 당대사 조절에 주요한 역할을 한다. Glucokinase는 hexokinase 보다 당에 대해 높은 특이적 기질농도 값(Km)을 갖고 있어서, 혈당의 변화에 따라 당인산화 속도를 적절히 변화시킬 수도 있고, 영양 상태나 호르몬 상태에 따라 그 활성도가 변화되어서 간의 총 당인산화 능력의 변화에 기여한다. 간 조직에서 glucose의 인산화를 촉매하여 glucose-6-phosphate로 만드는 당 분해과정에 관여하는 효소인 GK의 효소활성은 Table 3와 같다. 정상군의 0.41±0.02nmol/mg/protein/mg와 비교하여 당뇨대조군에서 0.09±0.03 nmol/mg/protein/mg를 나타내어 유의적인 감소를 나타내었으나 황백 에탄올 추출물 투여군에서 0.29±0.02 nmol/mg protein/mg로 유의적으로 증가하여 비정상적인 당대사 반응을

Table 3. The activities of the Cytosolic Glucose-6-phosphatase(Glucose-6-Pase), Glucose-6-phosphate Dehydrogenase(Glucose-6-PDH), and Glucokinase(GK) in Normal and Diabetic Rats Fed by ethanol Extract of *Phelladidron amurens Rupr*

Experimental group	Dose (mg/kg, b.w, p.o)	Glucose-6-Pase ¹⁾	Glucose-6-PDH ²⁾	Glucokinase ³⁾
Normal	-	3.52±0.03 ⁴⁾	0.15±0.03	0.41±0.02
STZ ⁵⁾ -control	-	4.13±0.02 [#]	0.08±0.02 [#]	0.09±0.03 [#]
STZ + <i>P.A</i> ⁶⁾	1000	2.86±0.02 [*]	0.81±0.02 [*]	0.29±0.02 [*]

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

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

³⁾nmole/mg/protein/min

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

정상화시켜 주고 있음을 알 수 있다.

4. 결론

본 연구는 혈당강하 작용에 대한 기초 자료를 얻고자 Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 95% ethanol로 추출한 황백 에탄올 추출물을 7일간 경구 투여한 후 혈당강하작용에 관여하는 glucose-6-pase, glucose-6-PDH, glucokinase 효소등의 작용을 관찰한 결과는 다음과 같았다.

1. STZ 유발 당뇨 흰쥐의 혈당은 황백 에탄올 추출물 1,000 mg/kg, b.w투여군에서 유의적인 감소를 나타내었다.

2. STZ 유발 당뇨 흰쥐의 Glycogen 함량은 황백 에탄올 추출물 투여 군에서 유의적인 증가를, G-6-pase활성은 황백 에탄올 투여군에서 유의적인 감소를, G-6-PDH와 GK 활성은 추출물 투여 군에서 유의적인 증가를 나타내었다.

이상의 결과로부터 황백 에탄올 추출물 1,000 mg/kg,b.w.를 STZ 유발 당뇨 흰쥐에게 투여한 결과 혈당강하 작용과 당대사에 관여하는 glucose-6-Pase, glucose-6-PDH, glucokinase 효소등의 작용을 개선시킴으로써 당뇨를 위한 기능성 신소재로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. S.H. Choi, J.R. Park, Lipid Modulatory Functions of Cysteine Compounds found in genus *Allium* plants in diabetic mice. *Korean. J. Food Nutrtrion*. Vol.23, No.1, pp.361-366, (2010).
2. J.G. Lee, J.Y. Choi, J.S. Oh, H.W. Jung, E.H. Choi, Isolation of melanin Biosynthesis Inhibitory Compounds from the *phelladendri* cortex. *Korean. J. Pharmacognosy*, Vol.38, No.4. pp.387-393 (2007).
3. J.J. Lee, S.H. Kim, B.S. Chang, J.B. Lee, C.S. Huh, J.J. Kimand Y.J. Baek. The Antimicrobial activity of medicinal plants extracts against helicobacter pylori, *korean. J. Food Science Technology*. Vol.31. No.3. pp.764-770(1999).
4. S.J. Kim, D.H. Cho, and H.K. Doo, Effects of kamijiwhong-tang on the glucose in diabetic rats induced by streptozotocin, Kyunghee university, *oriental medical, J*, Vol.15, No,2, pp.397-413(1992).
5. J.H. Hur and K.W. Ryu, Effects of kamijiwhong-tang on the glucose in diabetic rats induced by streptozotocin Kyunghee university, *oriental medical, J*, Vol,7, No,1 pp135-152(1984).

6. K.H. Kwack, S.H. Kim and H.J. Song, The Effects of kamijiwhong-tang & Discoreae Radix on the changes of blood glucose & serum in diabetic rats induced by alloxan *J. of oriental Medical pathology*, Vol.8, No.1. pp.137-156(1993).
7. Y.G. Lee and S.D. Kim, The Antidiabetic Effects of kamijiwhong-tang on Diabetes-prone BB rats. *Korean J. Food Science Technology* Vol.32, No.5, pp.1206-1212 (2000).
8. K.J. Park, H.S. Jin, S.H. Park, E.H. Kim and J.K. Kim, antihyperglycemia Effect of Medicinal plants mixture in streptozotocin-induced Diabetic rats. *Korean Society Food Science nutrition* Vol.37, No.12, pp.1554-1559(2008).
9. O.K. Kim, Antidiabetic and antioxidative effects of *Lycii fructus* in streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korean J. of pharmacognosy*. Vol.40, No.2, pp.128-136 (2009).
10. J.R. Williamson, K. Chang, M. Franges, K.S. Hasan, Perspectives in diabetic hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42, No.8, pp.801 (1993).
11. J.A. Manuel, M.J. Ayber, A.N. Riera, A. Grau, S.S. Sanchez, Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.74, No.10, pp.125(2001).
12. X. Yan, S. Masashiro, M. Kameyama, Y. Sada, Y. Nakanishi, T. Nagata, Extraction and Identification of antioxidants in the roots of yacon(*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agricultural. Food Chemistry*, 47, No.6, pp.4711(1999).
13. T. Sumio, K. Ito, A. Yoshimura, N. Noguchi, T. Ishida, The constituents relate to anti-oxidative and α -glucosidase inhibitory activities in yacon aerial part extract. *yakugaku zasshi*, 126, No.4, pp.665 (2006).
14. M.D. Meglasson, P.T. Burch, D.K. Berner, H. Najafi, F.M. Matschinsky, Identification of glucokinase as an alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic-cell. *Diabetes* 35, No.2 pp.1163(1986).
15. R. Ghosh, B. Mukherjee, M. A. Chatterjee, A novel effect of selenium on streptozotocin induced diabetic mice. *Diabetes Res.*, Vol. 25, No.2, pp.165 (1994).
16. S. Himeno, A. Takekawa, N. Imura, Special difference in hydroperoxide scavenging enzyme with special reference to glutathione peroxidase in guinea-pigs. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, Vol.104, No.9, pp.27(1993).