

대마 뿌리 및 줄기 추출물의 포도당 흡수 개선 효과 및 기전에 대한 비교 연구

진혜린¹ · 유가람^{1,2,3} · 김혁^{1,2,3} · 조규형⁴ · 김기현⁴ · 임동우^{1,2,3}

¹동국대학교 한의과대학 진단학교실, ²동국대학교 한의과대학 한의학연구소, ³토포랩 주식회사, ⁴경북바이오산업연구원 대마산업총괄지원단

A Comparative Study on the Efficacy and Mechanism of Improving Glucose Uptake of *Cannabis* Root and Stem Extracts

Hye-Lin Jin¹, Ga-Ram Yu^{1,2,3}, Hyuck Kim^{1,2,3}, Kiu-Hyung Cho⁴, Ki-Hyun Kim⁴, Dong-Woo Lim^{1,2,3}

¹Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University, ²Institution of Korean Medicine, Dongguk University, ³TOPO Lab., Co., Ltd., ⁴Gyeongbuk Institute for Bio Industry

Received: July 22, 2023

Revised: August 21, 2023

Accepted: August 29, 2023

Correspondence to: Dong-Woo Lim
Department of Diagnostics, College of
Korean Medicine, Dongguk University,
Dongguk-Ro 32, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-5833
Fax: +82-31-961-5833
E-mail: greatwoodong@dongguk.edu

Copyright © 2023 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: Despite the pharmacological potential of the roots and stems of hemp based on literatures, active research has not been conducted for a long time. Comparative experiments were conducted on antioxidant and anti-inflammatory effects and improvement of glucose uptake using *Cannabis* root and stem extracts.

Methods: Antioxidant contents in *Cannabis* root and stem extracts were examined with total phenolic, tannin, flavonoid assay. Anti-inflammatory properties were tested in lipopolysaccharides-treated RAW264.7 cells. Efficacy of *Cannabis* root and stem extracts on glucose uptake was investigated using fluorescent glucose analog (2-NBDG) in palmitate-treated HepG2 cells. The mechanism of action on metabolism was examined by western blot.

Results: Antioxidant and anti-inflammatory efficacy were greater in stem extracts, but improvements in glucose uptake performed under various conditions were found to be greater in root extracts. It is assumed that *Cannabis* root extracts exhibited an improvement in glucose uptake through mechanisms such as AMP-activated protein kinase activation, not depending on general antioxidant and anti-inflammatory effects.

Conclusions: Further research is needed on the mechanisms and substances that exhibit the anti-diabetic effects of *Cannabis* roots and stems.

Key Words: *Cannabis* root, *Cannabis* stem, Glucose uptake, Diabetes mellitus, Insulin resistance, Insulin mimetics

서론

삼 또는 대마 (*Cannabis sativa* L.)는 삼과 대마 속의 1년생 초본 식물로, 중국에서는 기원전 5000년경부터 쓰였을 정도로 오래된 약재이지만¹⁾ 현대사회에서의 대마는 향정신성 작용으로 인하여 일부 국가에서는 사용이 제한되고 있으며²⁾ 한국에서는 마약이라는 인식이 확립되어 있다. 국내의 대마 사용과 관련한 규제사항은 ‘마약류 관

리에 관한 법률’에 의해 규정되며 성숙한 대마의 뿌리와 줄기는 마약류에서 제외되는데³⁾, 이는 해당 부위에서는 향정신성 성분인 delta-8-tetrahydrocannabinol (THC), delta-9-THC 함량이 극히 낮게 검출되는 사실과 관련이 있다⁴⁾. 이처럼 규제 대상이 되는 환각성 성분이 없는 대마의 뿌리와 줄기는 약리학적 가능성에도 불구하고 규제로 인해 연구가 오랜 기간 진행되지 못했다.

대마에는 terpene, phenolic compounds를 포함하여 500

여 개의 화합물이 발견되었고, 그중 100종 이상의 칸나비노이드(cannabinoids)라는 특유의 복합물을 포함하고 있는데, 인체 내의 내인성 칸나비노이드(endocannabinoids)와 유사하다⁵⁾. 또한 대마의 뿌리와 줄기에는 항염증 작용이 있다고 알려졌으며^{6,7)} 항당뇨에도 효과가 있을 것이라 추측된다. 또한 대마 뿌리 추출물은 streptozotocin (STZ)를 주사하여 유도한 1형 당뇨 생쥐 모델에서 항당뇨 효능을 나타내었으며, 이와 관련된 vanillin, syringaldehyde, linoleate와 같은 물질을 보고한 연구가 있다⁸⁾. 또한 동의보감 탕액편에 대마의 뿌리는 마근(麻根)으로 거어, 지혈 효능이 있어 각혈, 붕루, 태루하혈, 토혈과 같은 한의병증에 사용된 기록이 있으며⁹⁾, 서양에서도 대마의 뿌리는 통풍과 관절염, 발열과 염증을 치료하기 위해 다양한 국가에서 쓰였다고 보고하였다⁷⁾.

당뇨병 발병률은 2030년까지 2억 8천만 명 이상의 환자가 전 세계적으로 발생할 것이며 2050년에는 4억 명을 넘을 것이라 추정된다¹⁰⁾. 당뇨병은 인슐린 분비가 되지 않아 발생하는 제1형 당뇨병과 인슐린 분비에도 불구하고 고혈당이 유지되는 제2형 당뇨병이 있다. 당뇨병 환자의 90% 이상은 제2형 당뇨병에 속하며, 췌장 베타 세포의 기능 결함으로 인한 인슐린 분비 저하 또는 말초조직에서의 인슐린 저항성 증가로 제2형 당뇨병이 유발된다¹¹⁾.

인슐린 저항성은 간, 근육 같은 조직에서 인슐린에 대한 세포의 반응에 결함이 생긴 것으로 포도당 방출이 손상되어 β 세포 인슐린 분비 증가로 체내에 인슐린 수치가 높아진 상태를 말한다¹²⁾. 대표적으로 지질대사 또는 당대사의 이상은 인슐린 저항성을 유발한다고 알려져 있다¹³⁾. 당뇨를 치료하기 위한 주요 기전으로 인슐린 의존적인 경로인 IRS/PI3K/AKT의 인산화를 증가시키는 경로¹⁴⁾와 포도당 수송체인 glucose transporter type 4 (GLUT4)의 증가에 관여하는 에너지 센서인 인슐린 비의존성 AMP activated protein kinase (AMPK) 경로가 있다¹⁵⁾. 일부 식물 유래 물질은 AMPK 경로를 활성화시켜 고혈당증과 인슐린 저항성을 개선한다는 보고가 있다¹⁶⁾.

염증은 외부로부터 침입한 병원균에 의한 감염 또는 생체 내부에서 위험 인자를 인식할 때 감염 이전의 정상적인 상태로 회복시킬 때 발생하는 방어체계이다. 염증은 생체 내 항상성을 유지하기 위해 필수적이지만 과한 염증 반응은 무분별한 세포의 기능장애와 괴사를 일으켜 면역 세포의 작동을 유지하여 만성 염증을 유발한다¹⁷⁾. 이러한

만성 염증은 제2형 당뇨병이나 자가면역 질환으로 발전될 수 있다¹⁸⁾.

본 연구에서는 대마의 뿌리와 줄기의 부위별 항산화 물질의 함량과 라디칼 소거능을 평가하고, lipopolysaccharides (LPS)를 처리한 대식세포 모델을 이용하여 염증성 마커에 미치는 영향을 비교하였다. 또한 뿌리 추출물과 줄기 추출물이 당 흡수능에 미치는 영향을 지방산을 처리한 세포 모델에서 비교 평가하였으며, 이에 관련된 기전의 분석을 통해 대마의 뿌리와 줄기 추출물의 의약품 개발 가능성을 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 대마 뿌리 추출물의 추출

본 연구에 사용된 대마 (*Cannabis sativa*) 뿌리와 줄기 에탄올 추출물은 경북바이오산업연구원 (GIB, Andong, Korea)으로부터 제공받아 사용하였다. 대마 뿌리와 줄기 원재료는 안동시 서후면에 소재한 재배농지에서 확보하였다. 대마를 수확한 후 뿌리와 줄기 부분으로 각기 분리하여 건조하고 잘게 분쇄한 후 실온에서 70% 에탄올을 이용하여 60 °C 항온수조에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 농축 및 동결건조 후 얻어진 대마 뿌리 및 줄기 추출물은 실험 전 phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 후 20 μ M syringe 필터로 여과하여 -20 °C에 보관하면서 사용하였다.

2. 세포주의 배양 및 계대

인간 간암 세포주(human hepatocellular carcinoma cell line)인 HepG2 세포와 마우스 대식세포주(mouse macrophage cell line)인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. HepG2 세포와 RAW264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco, USA)에 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

3. 세포 독성 측정

HepG2 세포와 RAW264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 FBS를 함유한 DMEM을 이용해 분주하고 24 시간 배양하였다. 이후 low glucose DMEM (1g/L glucose)

에 1% bovine serum albumin (BSA; MP Biomedicals, USA) 과 0.25 mM 또는 0.5 mM 팔미트산 (palmitic acid)을 넣어 60 °C에서 90분 동안 반응시킨 배지로 교환하였다. 이 때, 시료를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. EZ-Cytox (DoGenBio, Korea) 시약을 이용해 키트에 제공된 프로토콜에 따라 세포 독성 실험을 수행하고 microplate spectrophotometer 장비 (VersaMax, Molecular Devices, CA, USA)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다.

4. Nitric oxide (NO) 생성 억제능 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후 LPS (1 μ g/mL)와 시료를 처리하여 24시간 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. Griess A인 5% phosphoric acid, 1% sulfanilamide와 Griess B인 0.1% N-ethylene-diamine시약을 동일한 비율로 혼합하여 같은 양의 상등액과 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플의 산화질소 농도 정량은 다양한 농도의 NaNO₃을 표준물질로 표준검량곡선을 작성한 후 이를 이용하여 계산하였다.

5. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 항산화 실험

자유 라디칼 소거능 확인을 위해 Bondet의 방법으로 DPPH시약을 이용해 실험하였다. 0.3 mM DPPH 용액을 에탄올에 녹여 준비한 후 다양한 농도의 추출물과 10:1 비율로 혼합하여 실온에서 30분간 방치하였다. 반응 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 515 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 아스코르브산을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선을 통해 나타내었다.

6. 총 페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량 측정

총 페놀의 함량은 gallic acid를 표준 물질로 사용하여 Folin-Ciocalteu reaction의 방법에 따라 결정하였다. 70% 에탄올에 녹인 대마 뿌리와 줄기추출물을 0.05 mL에 2% Na₂CO₃용액 1 mL을 첨가하여 3분간 방치하였다. 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.05 mL을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 플라보노이드 함량은 (+)-catechin을 표준 물질로 사용하여 aluminium chloride colorimetric assay 방법으로 측정하였다. 대마 뿌리와 줄기 추출물을 250 μ L에 증류수 1 mL

과 5% NaNO₂ 0.075 mL을 가하고 5분 후 0.3 mL AlCl₃ · 6H₂O를 첨가하고 6분간 방치하였다. 1M NaOH를 500 μ L 가한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 탄닌의 함량은 tannic acid를 표준 물질로 사용하여 Folin-Denis법에 따라 측정하였다. 대마 뿌리와 줄기를 Folin-Denis 시약 100 μ L를 70% 에탄올에 7.5 mL이 될 때까지 넣어준다. 0.5 mL의 folin denis reagent를 가해준 뒤 1 mL의 20% Na₂CO₃를 첨가해준다. 10 mL이 될 때까지 70% 에탄올을 첨가한 뒤 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀, 플라보노이드, 탄닌의 실험 결과로 얻어진 흡광도 값을 표준 곡선을 통해 총 함량으로 환산하여 나타내었다.

7. Glucose uptake 측정

HepG2 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 48시간 high glucose로 배양 후, 팔미트산과 결합시킨 1% BSA함유 low glucose DMEM배지로 교체한 후, 시료와 함께 24시간 동안 배양하였다. Reference drug로 metformin 1 mM을 사용하였다. 세포를 1회 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 세척 후 glucose free DMEM배지 조건에 따라 100 nM 인슐린이 있거나 없는 상태에서 30분간 인큐베이터에서 배양시킨다. 100 μ M의 2-NBDG를 glucose free DMEM배지에 희석시킨 배지로 바꾸어 1시간 동안 배양시켜 세포가 흡수하도록 하였다. 이후 DPBS로 세척 후 흡수된 glucose 양은 fluorescence spectrophotometer (SpectraMax Gemini EM microplate reader, Molecular Devices, USA)로 Ex/Em=485/530 nm파장에서 형광 강도를 측정하였으며 세포의 형광 이미지를 형광 현미경으로 (Eclipse Ts2-FL, Nikon, Tokyo, Japan) 100x 배율로 촬영하여 그룹간 비교하였다.

8. Western blot

HepG2 세포를 100 mm plate에서 24 시간 배양 후 low glucose 배지로 교환하였다. 조건에 따라 위에서 기술한 것과 같은 방법으로 250 μ M 팔미트산을 선택적으로 처리할 때, 대마 뿌리나 줄기 시료를 함께 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. Protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 첨가된 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용해 세포에서 전체 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 bi-cinchoninic acid (BCA) 정량 방법에 따라 키트 (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)를 활용하여 다양한 농도의 BSA를 기

준으로 사용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질을 10% gel을 mini protean tetra cell gel electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 SDS-PAGE 후 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, 0.45 μm)으로 100V에서 60분 동안 단백질을 전이하였다. 이후 tween 20을 함유한 tris-buffered saline (TBS-T)로 세척하고 5% BSA함유 TBS-T로 90분 동안 blocking하였다. 3% BSA를 포함한 TBS-T에 희석한 1차 항체(1000:1)와 overnight 동안 반응시키고, 5분간 3회 세척하였다. 1% BSA를 포함한 TBS-T에 희석한 2차 항체(2000:1)는 2시간 동안 반응시키고 5분간 3회 세척하였다. ECL buffer (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific, USA)을 처리한 후 fusion solo (Vilber lourmat, Collegien, France) 장비를 이용해 블롯 이미지를 정량하여 샘플별 단백질 발현을 분석하였다. Western blot 의 결과는 각 샘플별로 해당 단백질의 발현양을 β -actin의 발현양으로 정량하고 이를 대조군의 값을 기준으로 표준화하여 나타내었다.

9. 통계처리

실험의 모든 데이터는 평균값과 표준편차 값의 차이 (mean \pm standard deviation) 로 나타내었다. GraphPad Prism version 5.0 (La Jolla, CA, USA)를 이용하여 각 군별 결과의 유의성을 one-way analysis of variance에 의해 판단하였으며 P값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과

1. 대마 뿌리와 줄기의 항산화 물질 함량 및 항산화능 비교 평가

대마 뿌리, 줄기 에탄올 추출물의 총 페놀, 탄닌 및 플

라보노이드 항산화 활성 결과는 다음 Table 1과 같다. 대마 뿌리의 에탄올 추출물의 총 페놀은 34.990 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 총 탄닌은 45.49 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 총 플라보노이드는 30.675 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났다. 대마 줄기의 에탄올 추출물의 페놀은 64.780 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 총 탄닌은 83.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 총 플라보노이드 함량은 48.764 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났다. 따라서 대마 뿌리와 줄기를 비교할 때 줄기에서 페놀, 탄닌, 플라보노이드 함량이 순서대로 각각 1.85, 1.83, 1.59 배 높았으며 DPPH 라디칼 소거능을 IC_{50} 의 수치로 측정하였을 때 줄기가 467.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 뿌리는 748.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 줄기에서 뛰어난 항산화 효능을 나타내었다.

2. RAW264.7에서의 대마 뿌리와 줄기 세포 독성 및 염증

대마 뿌리와 줄기 에탄올 추출물을 농도별로 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교하였다. 뿌리와 줄기는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 대조군과 비교하여 뚜렷한 감소가 나타나지 않았다(>90%). 이후 모든 실험은 세포 독성을 나타내지 않은 농도 내에서 실험을 진행하였다(Fig. 1A).

대마 줄기와 뿌리 에탄올 추출물의 NO 생성량을 확인한 결과, 추출물과 LPS를 처리하지 않는 무처리군에서 1.16 μM 의 NO가 생성되었으며, 추출물이 처리되지 않고 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 처리된 군에서 13.59 μM 의 NO가 생성되었다. NO 생성의 저해를 확인하기 위해 뿌리와 줄기 추출물(250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 LPS 동시 처리 시 대마 뿌리 에탄올 추출물에서 각각 9.24 μM 과 8.06 μM , 대마 줄기 에탄올 추출물에서 각각 8.96 μM 과 6.29 μM 으로 농도가 높을수록 NO 생성량이 유의하게 낮아진 것을 확인할 수 있다(Fig. 1B).

대마 뿌리 줄기 에탄올 추출물의 농도가 높을수록 NO의 생성량이 낮아짐에 따라 western blot으로 iNOS의 발현양을 확인하였다(Fig. 1C). LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리한 군의 iNOS 발현양은 큰 폭으로 증가함을 보였으며 뿌리와

Table 1. Total Phenolic Content, Tannin Content, Flavonoid Content, and DPPH Radical Scavenging Activity of Stem and Root Extract of *Cannabis sativa*

Antioxidant contents			Antioxidant activity	
Variable	TPC	TTC	TFC	DPPH (IC_{50}) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Stem ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	64.780 \pm 2.013	83.27 \pm 0.577	48.764 \pm 0.868	467.36
Root ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	34.990 \pm 0.573	45.49 \pm 0.509	30.675 \pm 0.270	748.54

Values presented as mean \pm standard deviation.

DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, TPC: total phenolic contents, TTC: total tannin contents, TFC: total flavonoid contents, IC_{50} : half-maximal inhibitory concentration.

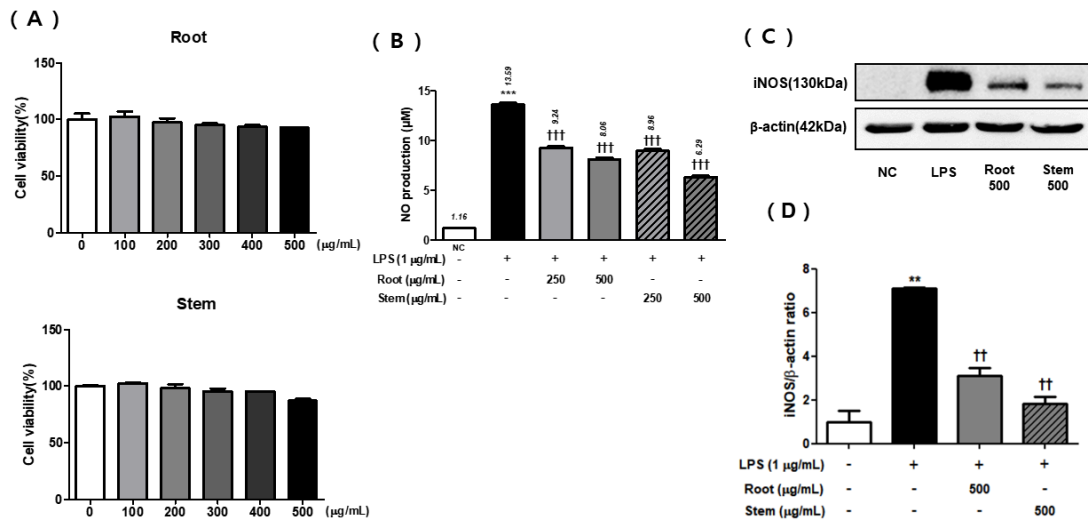


Fig. 1. Comparison of anti-inflammatory property of *Cannabis* root and stem extract. (A) Effect of *Cannabis* root and stem extract on RAW264.7 cell viability. (B) Inhibitory effect of *Cannabis* root and stem extract on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cell. (C) Inhibitory effect of *Cannabis* root and stem extract on cytosolic iNOS levels in LPS-stimulated RAW264.7 cell. (D) Densitometric analysis of iNOS protein expression. Results of protein levels were divided by β -actin protein levels and normalized to the non-treated control. NO: nitric oxide, LPS: lipopolysaccharide, iNOS: inducible nitric oxide synthase. * $P < 0.05$ vs non-treated group. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs LPS-treated control group.

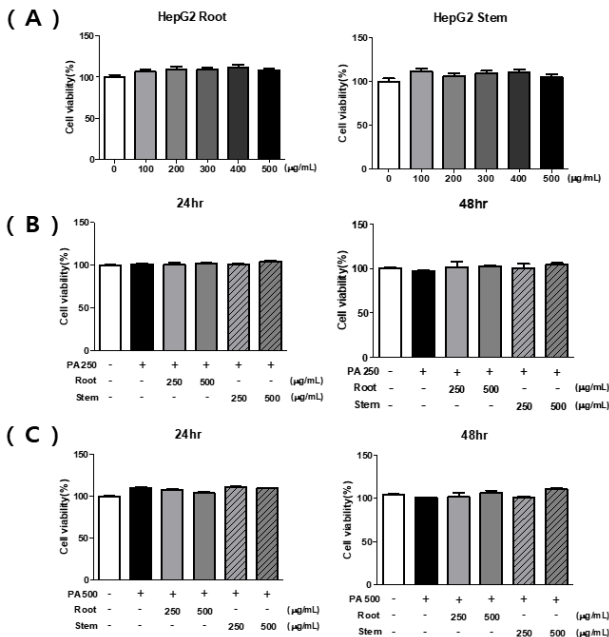


Fig. 2. Comparison of cell viability of *Cannabis* root and stem extract in different conditions. (A) Effect of *Cannabis* root and stem extract on intact HepG2 cell viability. Effect of *Cannabis* root and stem extract on (B) 250 μ M or (C) 500 μ M PA-treated HepG2 cell viability. PA: palmitic acid.

줄기는 각각 500 μ g/mL의 농도에서 iNOS의 발현이 유의하게 억제됨을 확인하였다(Fig. 1D).

3. HepG2에서의 대마 뿌리와 줄기 세포독성

HepG2 세포에서 샘플 처리에 의한 독성 측정 결과, 대마 뿌리와 줄기 에탄올 추출물은 500 μ g/mL까지 뚜렷한 독성이 나타나지 않았으며(Fig. 2A), 0.25 mM과 0.5 mM의 농도의 팔미트산을 시료와 함께 24시간 또는 48시간 동안 처리하였을 경우에도 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 2B, C). 본 실험으로 앞으로 수행할 시료와 시약의 농도를 결정하였다.

4. 대마 뿌리와 줄기의 포도당 흡수 개선

인슐린을 처리하지 않은 조건에서는 대마 뿌리나 줄기 추출물을 처리하였을 시 대체적으로 형광 밝기가 증가하여 포도당의 흡수 증가를 추정하였다(Fig. 3A). 한편 인슐린을 처리한 조건에서는 전반적으로 형광 밝기가 증가하여 대마 뿌리나 줄기 추출물의 추가적인 처리에 의해 큰 차이를 확인하기 어려웠다(Fig. 3B).

팔미트산과 인슐린을 처리하지 않은 조건에서 줄기 250 μ g/mL를 제외하고 유의미한 증가를 보였다. 한편, 인슐린을 처리한 조건 내에서 대조군끼리 비교 시 당 흡수능의 유의미한 증가가 있었으나($P < 0.05$) 뿌리나 줄기 추출물과 처리 군의 비교 시에는 유의미한 변화가 없었다(Fig. 4A).

팔미트산 0.25 mM을 처리한 조건에서는 팔미트산에 의

해 줄어든 당 흡수능($P<0.05$)이 뿌리 샘플 처리에 의해 유의하게 증가하였다. 또한 이 때, 인슐린을 처리하지 않은 대조군과 인슐린 처리 시의 대조군을 비교 시 유의미한 차이가 있었으며($P<0.05$), 해당 조건 내에서 뿌리 추출물 처리에 의해 저농도와 고농도 모두에서 유의미하게 당 흡수능이 증가함을 보였다(Fig. 4B).

팔미트산 0.5 mM을 처리한 조건에서는 마찬가지로 팔미트산에 의해 당 흡수능이 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 이때 고농도의 뿌리와 줄기 추출물에서 유의하게 당 흡수능이 증가한 것으로 나타났다. 한편, 인슐린을 처리하지 않은 대조군에 비해 인슐린 처리 시 대조군에서 당 흡수능이 증가하는 것을 마찬가지로 확인할 수 있었다($P<0.001$). 인슐린을 처리한 조건 내에서는 고농도의 뿌리 추출물 처

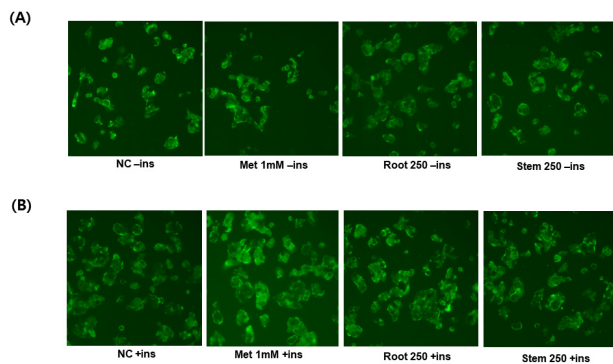


Fig. 3. Effect of *Cannabis* root and stem extract on glucose uptake assessed by relative microscopic analysis of fluorescence intensity (2-NBDG) in HepG2 cell. Representative microscopic images from (A) non-insulin treated, or (B) insulin treated conditions. Met: metformin. (100X).

리 조건에서 당 흡수능이 증가하였고 통계적인 유의성을 보였다(Fig. 4C). 많은 조건에서 상대적으로 줄기에 비해 뿌리에서 포도당 흡수가 증가한 것을 빈번히 확인할 수 있었다.

5. 대마 뿌리와 줄기의 당 흡수능과 관련한 신호에 미치는 영향

당 흡수능과 관련한 신호의 활성화를 보기 위해 대마 뿌리 및 줄기 추출물을 western blot 실험을 통해 확인하

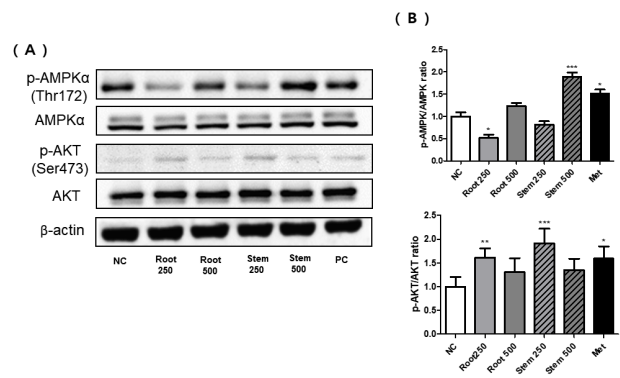


Fig. 5. Effect of *Cannabis* root or stem extract on phosphorylated protein levels of HepG2 cells. (A) Representative immunoblot images of key markers of AMPK and AKT with its phosphorylated form. Metformin was used as a reference drug (PC). (B) Assessment of phosphorylated protein ratio by densitometric analysis of band intensities. Results of phosphorylated protein levels were divided by non-phosphorylated protein levels and normalized to the non-treated control. The results presented here are based on a series of experiments conducted independently at least three times. AMPK: AMP-activated protein kinase, AKT: protein kinase B. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs non-treated control group.

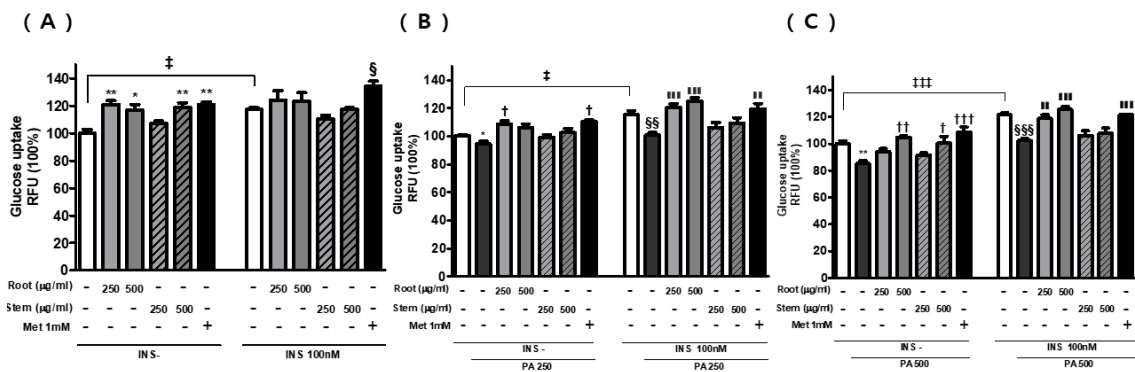


Fig. 4. Effect of *Cannabis* root and stem extract on glucose uptake assessed by relative fluorescence unit of fluorescence intensity in 2-NBDG HepG2 cells. Metformin was used as a reference drug. (A) Results obtained from intact HepG2 cells or (B) HepG2 cells treated with 250 μ M palmitic acid or (C) 500 μ M palmitic acid. RFU: relative fluorescence unit, Met: metformin, INS: insulin, PA: palmitic acid. * $P<0.05$ vs non-treated group. † $P<0.05$, †† $P<0.01$ vs PA-treated control group (insulin deprived condition). ‡ $P<0.05$ NC without insulin vs NC with insulin. § $P<0.05$ vs non-treated group. || $P<0.05$, ||| $P<0.01$ vs PA-treated control group (insulin-treated condition).

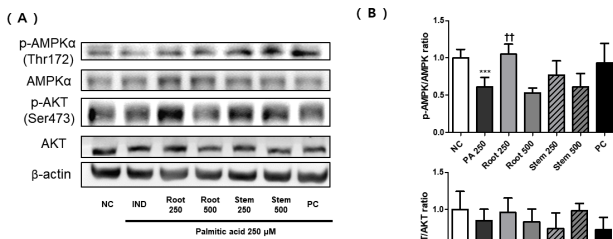


Fig. 6. Effect of *Cannabis* root or stem extract on phosphorylated protein levels of palmitic acid-treated HepG2 cells. (A) Representative immunoblot images of key markers of AMPK and AKT with its phosphorylated form. Metformin was used as a reference drug (PC). (B) Assessment of phosphorylated protein ratio by densitometric analysis of band intensities. Results of phosphorylated protein levels were divided by non-phosphorylated protein levels and normalized to the non-treated control. The results presented here are based on a series of experiments conducted independently at least three times. AMPK: AMP-activated protein kinase, AKT: protein kinase B, IND: palmitic acid-induced group, PA: palmitic acid. * $P < 0.05$ vs non-treated control group. † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$ vs palmitic acid-treated control group.

였다(Figs. 5, 6).

우선 팔미트산을 처리하지 않은 조건에서는 p-AMPK의 신호는 고농도의 뿌리와 줄기 추출물의 처리에 의해 증가한 양상을 보였으며 뿌리에 비해 줄기에서 더 높은 활성을 보였다. 한편 p-AKT는 p-AMPK와는 반대로 저농도의 뿌리와 줄기 추출물 처리에 의해 더욱 높은 활성을 보였다(Fig. 5A, B).

또한 0.25 mM 농도의 팔미트산을 처리한 조건에서는, 저농도 뿌리 추출물이 유의하게 p-AMPK의 증가를 유도했지만 p-AKT는 전 샘플과 농도에서 유의적인 결과를 나타내지 않았다(Fig. 6A, B).

고찰

본 연구에서는 대마의 뿌리와 줄기의 70% 에탄올 추출물에 대한 항산화, 항염증, 당 흡수능에 대한 비교 평가를 통해 해당 소재에 대한 약리학적 개발 가능성을 평가하였다. 주로 대마의 다양한 약리학적 효능이 칸나비노이드 성분에 의해 나타나는 것과 달리, 대마의 뿌리와 줄기에서는 이러한 칸나비노이드 성분이 극미량 포함되어 있거나 검출되지 않는 것으로 보고되고 있다¹⁹⁾. 그럼에도 불구하고 대마의 뿌리와 줄기에는 다양한 triterpenoids, mono-

terpenes, alkaloids, sterol 등의 성분을 포함^{7,20)}하고 있어 그 약리학적 가능성이 기대되었다.

한편, 본 연구에서는 환원당 물질인 2-NBDG를 활용하여 당 흡수능을 대사 이상을 유도하지 않은 정상 모델과 두 가지 다른 농도의 palmitic acid로 대사 이상을 유도한 모델에서 대마 뿌리 추출물과 줄기 추출물의 효능을 비교하여 확인하였다(Fig. 4). 또한 각각의 조건에서 인슐린을 처리한 조건과 처리하지 않은 조건에서 효능을 비교하였다.

세 가지 다른 조건에서 대마 줄기 추출물은 뿌리 추출물에 비해 우수한 당 흡수능을 나타내지 못했다. 우선 인슐린이 없는 상태에서 뿌리와 줄기 추출물 모두 고농도에서 당 흡수능을 유의하게 증가시킨 것을 확인하였는데, 반면 인슐린과 뿌리 및 줄기 추출물의 동시 처리 시의 결과는 인슐린만 처리한 조건의 당 흡수능 결과와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A).

또한 palmitic acid와 뿌리 및 줄기 추출물의 24시간 동시 처리를 한 조건에서는, palmitic acid 처리에 의해 감소한 당 흡수능이 주로 뿌리 추출물의 처리에 의해 개선된 결과를 나타내었다(Fig. 4B, C). 한편, 줄기의 경우, 유의미한 당 흡수능 개선 효과가 나타나지 않는 결과가 많았으며, 특히 인슐린이 있는 조건에서는 뿌리와 줄기 추출물 처리에 의한 흡수능의 차이가 더욱 크게 나타났다.

본 연구의 뿌리와 줄기 추출물에 대한 페놀, 탄닌, 플라보노이드 등 항산화 물질 함량의 평가 결과, 뿌리보다는 줄기에서 많은 함량이 검출되었다(Table 1). 이는 DPPH 라디칼 소거능 시험 결과 줄기가 뛰어난 항산화능을 나타낸 것과 일치하였다. 뿌리와 줄기의 추출 성분이 다르다는 보고의 결과²⁰⁾를 참고할 때, 대마의 뿌리와 줄기 추출물의 다른 항산화 효능은 각 부위에 함유 및 추출된 성분 및 함량의 차이에 기인할 것으로 추정된다. 이 결과는 세포 생존율 이내의 농도를 처리한 대식세포의 염증성 마커의 분석 결과에서도 일치하게 나타났다(Fig. 1B-D). 상대적으로 뿌리보다 줄기에 많이 포함된 항산화 물질이 LPS에 의해 자극된 대식세포에서 염증 cascade의 활성화를 억제한 것으로 추측해 볼 수 있다.

한편 palmitic acid를 포함한 고농도의 지방산 처리에 의한 세포의 대사 이상은 다양한 논문을 통해 보고되어 있으며 인슐린 저항성은 이미 잘 알려진 기전 중 하나이다²¹⁾. 특히 고농도 지방산에 의한 산화적 스트레스는 다양한 조직에서 인슐린 신호 전달을 방해하여 인슐린 저항

성을 유도하는데²²⁾, 이는 간, 근육, 지방조직 등에서 대사 이상을 일으키는 한 원인이 된다. 또한 자연에 존재하는 다양한 화합물은 고농도 혈당에 의해 나타나는 염증성 반응을 조기에 차단시키며, 대사 이상의 세포에서 당 흡수능을 개선시킬 수 있다²³⁾.

하지만 대마의 뿌리 및 줄기 추출물의 당 흡수능 효과를 비교하였을 때, 항산화능과 항염증 효과가 상대적으로 뛰어난 줄기에 비해 뿌리가 더 뛰어난 결과를 반복적으로 나타내었다. 이 결과는 이들 추출물에서 나타나는 당 흡수능 개선 효능이 단순히 추출물에서 유래한 항산화 및 항염증 기전에 의하지 않는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 자연에 존재하는 일부 약용식물은 생체내에서 인슐린과 유사한 기능을 하는 물질을 가지는데, 이들은 인슐린 유사체로서 당뇨 치료에 효능을 나타낸다고 알려져 있다²⁴⁾. 인슐린과 동시 처리 시 대마 뿌리나 줄기 추출물의 추가적인 당 흡수 개선 효능이 나타나지 않는 여러 결과를 통해, 인슐린 기능과 유사한 역할을 하는 물질이 뿌리나 줄기에 함유되어 있을 가능성이 있음을 추측해 볼 수 있다. 앞선 연구에서는 STZ를 투여하여 제1형 당뇨를 유발한 쥐에서 대마 뿌리 에탄올 추출물을 복용한 그룹은 즉각적이고 유의미한 혈당 강하효과와 더불어 췌장의 염증 완화와 베타세포 보호 등의 효능을 보고하였는데, 이는 대마 뿌리 추출물이 인슐린 유사 작용을 나타낸 것으로 본 연구와 유사한 결과로 이해할 수 있다⁸⁾. 또한 palmitic acid를 처리한 조건에서 줄기가 뚜렷한 당 흡수능 개선 효과를 나타내지 못하였는데, 이는 western blot에서 줄기 추출물이 AMPK 및 AKT의 인산화 비율을 유의하게 증가시키지 못한 결과와 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다.

본 연구는 같은 추출 방식으로 준비한 대마 뿌리와 줄기 추출물을 이용하여 당 흡수능 개선 효과를 실험으로 확인하였으며, 뿌리 추출물이 줄기 추출물에 비해 뛰어난 효과를 나타내었다. 대마 뿌리의 당 흡수능 개선에 대한 자세한 기전과 생리활성 물질에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결론

대마의 뿌리와 줄기 추출물을 이용한 비교 연구에서, 줄기 추출물이 높은 항산화능과 항염증 효능을 나타내었음에도 불구하고 뿌리 추출물에서 더욱 뛰어난 당 흡수능

개선효과를 확인할 수 있었다. 대마 뿌리 추출물은 일반적인 항산화 및 항염증에 의존하지 않고 AMPK 활성화와 같은 기전을 통해 포도당 흡수의 개선을 나타낸 것으로 추정된다. 대마 뿌리와 줄기의 항당뇨 효능에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 ‘한의학 혁신기술개발사업’의 재정 지원을 받아 수행된 연구임(과제고유번호: HF23C0112).

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

1. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabis sativa: a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol.* 2018 ; 227 : 300-15.
2. Hall W, Solowij N. Adverse effects of cannabis. *Lancet.* 1998 ; 352(9140) : 1611-6.
3. Han K, Lee MJ, Kim H. Understanding of medical cannabis and its regulations: a suggestion for medical and scientific needs. *J Korean Med Obes Res.* 2016 ; 16(2) : 124-32.
4. Park HS, Oh HH, Kim S, Park JY, Kim J, Shim H, et al. Cannabinol synthase gene based molecular markers for identification of drug and fiber type cannabis sativa. *Kor J Pharmacog.* 2021 ; 52(2) : 69-76.
5. Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk E, Schibano D, Simsir Y, Navarro P, et al. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of cannabis sativa plants from different chemotypes. *J Nat Prod.* 2016 ; 79(2) : 324-31.
6. Kim YN, Sim KS, Park S, Sohn HY, Kim T, Kim JH. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of cannabis sativa stem extract. *J Med Food.* 2022 ; 25(4) :

- 408-17.
7. Ryz NR, Remillard DJ, Russo EB. Cannabis roots: a traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017 ; 2(1) : 210-6.
 8. Kim Y, Kim W, Kim SH, Sim KS, Kim KH, Cho KH, et al. Protective effects of hemp (*cannabis sativa*) root extracts against insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Molecules.* 2023 ; 28(9) : 3814.
 9. Heo J. *Dongeuibogam.* Seoul : Bupin Publisher. 1999.
 10. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 ; 87(1) : 4-14.
 11. Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Médeau V, Kevorkian JP. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2008 ; 34 Suppl 2 : S43-8.
 12. Wolosowicz M, Prokopiuk S, Kaminski TW. Recent advances in the treatment of insulin resistance targeting molecular and metabolic pathways: fighting a losing battle? *Medicina (Kaunas).* 2022 ; 58(4) : 472.
 13. Farese RV Jr, Zechner R, Newgard CB, Walther TC. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab.* 2012 ; 15(5) : 570-3.
 14. Mokashi P, Khanna A, Pandita N. Flavonoids from *enicostema littorale* blume enhances glucose uptake of cells in insulin resistant human liver cancer (HepG2) cell line via IRS-1/PI3K/Akt pathway. *Biomed Pharmacother.* 2017 ; 90 : 268-77.
 15. Li Y, Tran VH, Koolaji N, Duke C, Roufogalis BD. (S)-[6]-Gingerol enhances glucose uptake in L6 myotubes by activation of AMPK in response to $[Ca^{2+}]_i$. *J Pharm Pharm Sci.* 2013 ; 16(2) : 304-12.
 16. Balbaa M, El-Zeftawy M, Abdulmalek SA. Therapeutic screening of herbal remedies for the management of diabetes. *Molecules.* 2021 ; 26(22) : 6836.
 17. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006 ; 8 Suppl 2 : S3.
 18. Rajendram R, Saraswathy S, Rao NA. Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in early experimental autoimmune uveoretinitis. *Br J Ophthalmol.* 2007 ; 91(4) : 531-7.
 19. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci.* 2016 ; 7 : 19.
 20. Judžentienė A, Garjonytė R, Būdienė J. Phytochemical composition and antioxidant activity of various extracts of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivated in lithuania. *Molecules.* 2023 ; 28(13) : 4928.
 21. Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2010 ; 285(39) : 29965-73.
 22. Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.* 2017 ; 40(5) : 257-62.
 23. Pan Y, Wang Y, Cai L, Cai Y, Hu J, Yu C, et al. Inhibition of high glucose-induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2012 ; 166(3) : 1169-82.
 24. Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012 ; 2(4) : 320-30.