흑수정찰맥강 주정추출물의 고지방식이와 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨병 마우스에서 혈당조절 작용

함주리^{1*} · 이미자^{2*} · 이해인³ · 이현진² · 김현영² · 서우덕² · 손영진⁴ · 이미경³

¹(재)목포수산식품지원센터, ²국립식량과학원 작물기초기반과

³순천대학교 식품영양학과, ⁴순천대학교 약학과

Anti-Diabetic Activity of Heuksoojeongchal Bran Prethanol Extract in HFD/STZ-Induced Diabetic Mice

Ju Ri Ham^{1*}, Mi Ja Lee^{2*}, Hae-In Lee³, Hyun-Jin Lee², Hyun Young Kim²,
Woo Duck Seo², Young-Jin Son⁴, and Mi-Kyung Lee³

¹Mokpo Marine Food-Industry Research Center

²Crop Foundation Division, National Institute of Crop Science

³Department of Food & Nutrition and ⁴Department of Pharmacy, Sunchon National University

ABSTRACT Heuksoojeongchal was developed as a new black barley variety in the National Institute of Crop Science, RDA. We had previously discovered that Heuksoojeongchal bran prethanol extract (HSB) exhibits α -glucosidase inhibition activity. Therefore, this study sought to evaluate the anti-diabetic effects of HSB and its underlying mechanism using high-fat diet (HFD) and streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. HSB (200 mg/kg) was orally administered to the diabetic mice for 6 weeks. HSB significantly reduced fasting blood glucose compared to the control group. Insulin immunohistochemistry staining revealed that the insulin expression in the β -cells of the islets of Langerhans in the HSB group was greater than that of the control. HSB increased hepatic glycogen content and glucokinase mRNA expression and decreased gluconeogenic genes (G6Pase and PEPCK). HSB significantly lowered serum and hepatic lipid contents as well as hepatic lipid droplets in diabetic mice, which are attributable to the down-regulated lipogenic gene (PPAR γ) and up-regulated lipid oxidation genes (PGC1 α , ACSL1, and CPT1 α) in the liver. Furthermore, HSB significantly down-regulated hepatic inflammatory genes (NF κ B, TNF α , and IL-6) expression in diabetic mice. Thus, HSB improved HFD/STZ-induced diabetes by partly modulating the glucose, lipid, and inflammation metabolism-related gene expression.

Key words: Heuksoojeongchal bran, diabetes, blood glucose, hepatosteatosis, inflammation

서 론

고혈당을 특징으로 하는 당뇨병은 신체의 대사장애와 합병증을 유발하기 때문에 세계적인 공중 보건 문제로 주목받고 있다(Ramachandran 등, 2013). 현재 전 세계적으로 성인의 당뇨병 환자 수는 4억 6천 300만 명이며 2045년 당뇨병 환자는 7억 명에 달할 것으로 예측하고 있다(International Diabetes Federation, 2019). 우리나라도 대한당뇨병학회에서 발간한 diabetes fact sheet in Korea 2020에 따르

면 30세 이상 성인 당뇨병 환자는 494만 명으로 성인 7명 중 1명은 당뇨병을 가지고 있으며, 65세 이상 인구에서는 약 27.6%로 10명 중 3명이 당뇨병이다(Korean Diabetes Association, 2020).

당뇨병 환자의 90%를 차지하는 제2형 당뇨병은 비만 인구의 증가와 밀접한 상관관계를 보이며 인슐린 저항성을 특징적으로 한다(Zheng 등, 2018; Choi, 2009). 비만으로 인한 체내 유리지방산 증가는 인슐린 신호전달경로를 손상시켜 인슐린 수용체의 민감성을 낮추고 인슐린 저항성을 유도

Received 22 March 2021; Revised 9 April 2021; Accepted 16 April 2021

Corresponding author: Mi-Kyung Lee, Department of Food and Nutrition, Sunchon National University, 255 Jungangro, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea, E-mail: leemk@scnu.ac.kr

Author information: Hae-In Lee (Professor), Young-Jin Son (Professor), Mi-Kyung Lee (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한다. 이러한 인슐린 저항성은 포도당 흡수 및 대사장애를 유발하여 혈당 상승, 고지혈증, 고혈압 등을 유도한다(Martyn 등, 2008; Kim 등, 2020; Shulman, 2000). 따라서 제2형 당뇨병 예방 및 개선에 효과적인 천연물 소재 탐색 연구가 계속되고 있다.

보리(*Hordeum vulgare*)는 대표적인 혈당지수가 낮은 곡류로 quinines, chalcones, flavonols, flavones, flavanones, amino phenolic compounds와 같이 다양한 페놀성 화합물을 함유하고 있는 식품이다(Carvalho 등, 2015). 특히, 흑색보리는 cyanidin과 delphinidin의 anthocyanin 계통의 천연색소를 다량 함유하고 있어 일반보리보다 항산화 성분이 높은 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 2007). 보리는 메성보리와 찰성보리로 구분되는데, 찰성보리는 메성보리보다 아밀로펙틴 함량이 높아 취반 특성과 식감이 좋아서 식용으로 더 선호하기 때문에(Cha 등, 2012; Bae 등, 2009) 농촌진흥청 국립식량과학원에서는 흑색 찰성보리인 ‘흑수정찰’을 개발하였다(Kim 등, 2018). 체내 혈중 콜레스테롤 조절, 체지방 축적 조절 등에 효과적이라 알려져 있는 β -glucan 함량은 찰성보리가 메성보리에 비해 1.0~2.5% 높고 보리의 배유조직보다 껍질을 포함하는 외층부 및 배아 부위 등의 맥각에 더 많이 함유되어 있다(Kalra와 Jood, 2000; Lee와 Lee, 1994; Kim 등, 2018). 이와 같이 맥각은 섬유소와 생리활성 물질들을 많이 포함하고 있지만 보리의 가공부산물로 대부분 사료로 이용되거나 폐기되고 있다(Lee 등, 2018).

Ramakrishna 등(2017)은 흑색 보리품종의 α -glucosidase 저해 활성이 다른 보리품종에 비해 34% 높다고 보고하였다. 본 연구진의 선행연구에서도 여러 품종 맥각 중 흑수정찰맥각 주정추출물이 농도 의존적(2.5, 5, 10 mg/mL)으로 α -glucosidase 저해 활성을 보였으며, 10 mg/mL 농도에서는 90% 이상으로 활성이 높았다(unpublished). 따라서 본 연구는 흑수정찰맥각 주정추출물의 항당뇨 소재 가능성을 밝히기 위하여 고지방식이와 스트렙토조토신(STZ)으로 제2형 당뇨병을 유도한 마우스를 이용하여 혈당조절 및 관련기전을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

흑수정찰맥각 주정추출물(HSB) 제조

흑수정찰맥각 분말 100 g에 헥산 1 L를 첨가하여 실온에서 24시간 교반 과정을 3번 진행하여 탈지하고 여과(Whatman No.3, Whatman, Maidstone, UK)한 후, prethanol 1 L로 3회 추출하였다. 추출액은 회전진공증발장치(Eyela Co., Ltd., Shanghai, China)를 이용해 농축한 다음 동결건조하여 시료로 사용하였다. HSB의 수율은 3.16%였으며, 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 각각 11.30 ± 1.83 mg gallic acid equivalent/g과 2.94 mg catechin equivalent/g이었다.

실험동물 사육

본 동물실험은 순천대학교 동물실험 윤리위원회에서 승인되었으며 제시된 사육지침에 따라 수행되었다(SCNU IACUC-2020-05). 4주령 된 C57BL/6N 수컷 마우스(OrientBio, Seongnam, Korea)를 1주간 사육환경에 적응시킨 후 Research Diets사의 고지방식이(D12451, 전체열량의 45% 지방, New Brunswick, NJ, USA)를 4주간 급여하여 인슐린 저항성을 유도한 후 50 mg/kg의 STZ(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 5일간 연속 복강 주사하였다. 7일 후 혈당이 300 mg/dL인 마우스만을 사용하여 난괴법으로 당뇨 대조군(Con)과 흑수정찰맥각 주정추출물(HSB)군으로 각각 10마리씩 배치하여 6주간 폴리카보네이트 사육상자에 한 마리씩 분리하여 사육하였다. HSB(200 mg/kg)는 증류수에 녹여 존데를 이용해 매일 일정한 시간에 경구투여 하였으며 대조군은 동일량의 증류수를 투여하였다. 동물사육실의 환경은 항온($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 항습($50 \pm 5\%$), 12 시간 간격(08:00~20:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하였고 식이와 식수는 자유롭게 섭취(*ad libitum*)하도록 하였다. 체중은 매주 일정 시간에 측정하였으며 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 식이 제공량으로부터 뺀 값을 기록하였다.

6주 사육 후 12시간 동안 절식시킨 다음 에테르(Daejung, Siheung, Korea)로 흡입 마취시켜 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취한 후 원심분리($900 \times g$, 15분, 4°C)하여 혈청을 분리하였다. 췌장과 간조직은 적출하여 생리식염수로 헹군 뒤 표면의 수분을 제거하여 액체질소에 급냉시킨 후 -80°C 에 보관하였다.

혈당, 내당능 검사 및 혈청의 인슐린과 아디포넥틴 함량 분석

주별 혈당은 매주 6시간 절식 후 꼬리 채혈하여 혈당측정기(GlucoDr supersensor, Allmedicus, Anyang, Korea)로 측정하였다. 내당능 검사는 6주째 절식(6시간) 후 체중 kg당 포도당 용액을 1 g씩 경구투여한 다음 0, 30, 60, 120분에 혈당을 측정하였다.

혈청의 인슐린 농도와 아디포넥틴은 각각 마우스 인슐린(Miobs, Tokyo, Japan)과 아디포넥틴(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) ELISA kit을 사용하여 측정하였다.

혈청과 간조직의 지질 함량 측정

혈청 중의 중성지질과 총 콜레스테롤 함량은 각각 측정용 kit(Asan Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였으며, 유리지방산 함량은 측정용 kit(Shinyang Diagnostics, Seoul, Korea)으로 측정하였다. 간조직의 지질 함량은 Folch 등(1957)의 방법에 따라 클로로포름:메탄올(2:1, v/v) 혼합액으로 지질을 추출한 후 혈청과 동일한 방법으로 측정하여 함량을 구하였다.

체장과 간조직의 형태학적 분석

체장조직과 간조직은 10% 포름알데히드 용액에 24시간 고정한 다음 수세하고 60% 에탄올에서부터 상승농도로 탈수하고 파라핀에 포매하여 4 µm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin(H&E) 염색한 다음 광학현미경에서 200배 배율로 관찰하였다. 또한 체장에서 인슐린의 발현량 변화를 관찰하기 위하여 위와 같은 방법으로 조직 절편을 제작하여 avidin-biotin complex(ABC) 방법으로 β-세포에 대하여 인슐린 면역조직화학 염색을 실시하였다.

간조직의 글리코겐 함량 측정

글리코겐 함량은 수정된 Seifter 등(1950)의 방법에 따라 측정하였다. 간조직 1 g에 30% KOH 용액을 첨가하여 균질화한 용액을 100°C에서 30분간 가열한 후 에탄올로 침전시키고 증류수에 녹였다. 여기에 anthrone 시약을 가하여 100°C에서 10분간 반응시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 포도당 표준액을 이용하여 정량하였다.

간조직 중의 RNA 분리 및 real-time PCR 분석

Total RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 추출하여 정제하였으며, 추출된 RNA는 Nano Drop 2000(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 정량하였다. 이후 ReverTra Ace qPCR RT master mix(Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. mRNA 발현은 SYBR green PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany)과 CFX96 Touch™ real-time PCR detection system(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 real-time PCR 분석을 실시하였다. 분석한 유전자들과 primer sequence는 Table 1에 제시하였다. Threshold cycle(Ct) 값은 형광커브와 역치선

이 만나는 cycle 값으로 CFX3.1(Bio-Rad Laboratories)로 분석하였다. 각각의 유전자 발현은 동일한 시료의 Gapdh 발현을 측정하여 보정하였으며, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법(Livak와 Schmittgen, 2001)을 사용하여 계산되었다.

통계처리

실험 결과는 SPSS(version 26.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계학적으로 분석하였다. 결과는 최소값과 최대값의 25~75 백분위 수를 표시하는 box plot 방식으로 제시하였으며, 최대값과 최소값은 각각 위와 아래 수염(whisker)으로 나타내었다. 두 실험군 간의 통계적 유의성 검정은 $P < 0.05$ 수준에서 Student's *t*-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

HSB 급여가 공복 혈당, 혈청 인슐린 함량 및 체장 면역조직학적 변화에 미치는 영향

당뇨병 환자에서 혈당조절이 되지 않고 고혈당이 계속되면 당뇨병성 신증, 망막병증 등의 합병증이 발생하므로 공복 혈당은 당뇨병 환자 치료의 중요한 지표이다(Mullarkey 등, 1990; Shin과 Ryu, 2008). 본 연구결과 HSB 급여 4주째부터 대조군에 비해 유의적인 혈당 감소를 보여 실험 종료 시 14%의 혈당 개선을 보였다(Fig. 1A). Park과 Yoon(2018)은 보리 함량이 99.8%인 보리 숙면을 고지방 식이와 STZ로 유발한 제2형 당뇨 동물 모델에게 급여했을 때 당뇨 대조군에 비해 공복 혈당이 26.9% 낮았다고 보고하였다. Deng 등(2020a)도 통보리를 *db/db* 마우스에 급여했을 때 혈당 개선을 보고하여 본 결과와 유사하였다. 본 연구진의 선행연구에서 HSB가 다른 보리맥강 추출물보다 α-glucosidase

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene	Full name	Forward/Reverse (5'-3')
Glucose metabolism related gene		
Gk	Glucokinase	GTCTTCACGCTCCACTGTCC/GGTGTAACGACGCTCAGTAAC
G6pase	Glucose-6-phosphatase	ACTGTGGGCATCAATCTCCT/TGTTGCTGTAGTAGTCGGTG
Pepck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	ACTGTTGGCTGGCTCTCACT/GGATGGGCACTGTGTCTCTC
Lipid metabolism related gene		
Pparγ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	CTGGCCTCCCTGATGAATAAAG/GGTGGGACTTTCCTGCTAATAC
Srebf	Sterol regulatory element-binding protein 1c	AACCTCATCCGCCACCTG/TGGTAGACAACAGCCGCATC
Fasn	Fatty acid synthase	TTGGAGCTAAGGCATGGTGG/GCAGTTGTCTCTGGATGCT
Pgc1α	Pparγ coactivator 1α	CCCACAACCTCCTCATAAAG/CCCAAGGGTAGCTCAGTTTATC
Acs1l	Long-chain fatty acid CoA ligase 1	CGCACCTTCCAACCAACAC/TCGTCGTAGTAGTACACCAAGAGC
Cpt1α	Carnitine palmitoyltransferase 1α	ATCTGGATGGCTATGGTCAAGGTC/GTGCTGTCATGCGTTGGAAGTC
Inflammatory metabolism related gene		
Nfκb	Nuclear factor-κB	GAAGTGAGAGAGTGAGCGAGAGAG/CGGGTGGCGAAACCTCCTC
Tnfa	Tumor necrosis factor α	AAAGACACCATGAGCACAGAAAGC/GCCACAAGCAGGAATGAG AAGAG
Il6	Interleukin 6	AGTCCTTCCTACCCCAATTTCC/TGGTCTTGGTCCCTTAGCCAC
Housekeeping gene		
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAGGTCATCCCAGAGCTGAA/CTGCTTCACCACCTTCTTGA

Fig. 1. Effects of HSB on fasting blood glucose level (A), pancreas insulin immunohistochemistry & H&E staining (B), serum insulin content (C), glucose tolerance test (D), and body weight & food intake (E) in HFD/STZ-induced diabetic mice. A, E: Values are mean $\pm$ SE, B: magnification 200 $\times$, A, C, D: Horizontal bars are median, upper, and lower edges of box are 75th and 25th percentiles; lines extending from box are minimum and maximum value. Values are significantly different between groups according to Student's *t*-test. **P*<0.05.

저해 활성이 높음을 확인한 바 있다(data not show). 고지방 식이와 STZ의 투여는 췌장의 β -세포 기능장애와 인슐린 분비능을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Srinivasan 등, 2005). 그러나 현재까지 *in vivo* 상태에서 HSB의 혈당 개선은 보고된 바는 없다. 따라서 본 실험에서는 HSB의 혈당 저하 기전을 살피기 위하여 췌장조직 β -세포의 H&E와 인슐린 염색을 실시한 결과 대조군에 비하여 HSB군의 β -세포가 크고 분명한 형태를 보였으며, 인슐린 염색도 많이 보였다(Fig. 1B). 이는 혈청의 인슐린 함량이 유의적이지 않으나 HSB군이 대조군보다 높음(Fig. 1C)과 연관되는 것으로 사료된다. 일반적으로 제2형 당뇨 동물모델은 고인슐린혈증에서 시작되나 고혈당이 지속되면 인슐린 함량이 낮아진다(Kim 등, 2012). 이와 같이 HSB는 제2형 당뇨병 마우스의 혈당을 개선하여 인슐린 저하를 억제한 것으로 판단된다. 그러나 인슐린 민감성의 한 지표로 사용되는 내당능은 HSB가 개선하였으나 통계적 유의성을 보이지 않은 것(Fig. 1D)은 혈청 인슐린 함량변화와 유사한 경향이었다. HSB는 당뇨 마우스의 체중과 식이 섭취량에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1E).

HSB 급여가 당뇨병 마우스의 간조직내 당대사 변화에 미치는 영향

HSB의 혈당 저하 효과가 간조직의 당대사와 관련성이 있는지를 살펴보기 위하여 간조직의 당대사 관련 유전자 발현과 글리코겐 함량을 측정하였다.

정상인은 인슐린이 증가하면 당신생이 중지되고 당분해 과정이 진행되어 정상혈당을 유지하나, 제2형 당뇨병 환자의 경우 인슐린 저항성으로 인해 인슐린 민감성이 저하되어 당신생 대사가 계속되고 이로 인해 고혈당 증상을 보인다(Schenk 등, 2008). 간조직의 당분해에 관여하는 Gk(glucocokinase) 유전자는 대조군에 비해 유의적으로 높았으나, 당신생 유전자인 G6pase(glucose 6-phosphatase)와 Pck(phosphoenolpyruvate carboxykinase) 발현은 유의적으로 낮았다(Fig. 2A). Gk는 포도당 이용을 조절하는 주요 인자로 해당과정을 촉진하거나 포도당을 글리코젠으로의 저장을 촉진하는 역할을 한다(Tahrani 등, 2011). 본 연구에서도 간조직의 글리코젠 함량이 대조군에 비해 HSB군에서 1.3배 증가하였다(Fig. 2B). 당뇨병의 경우 Gk가 감소하여 당대사 이용률을 저하시키기 때문에 Gk의 활성을 높여

Fig. 2. Effects of HSB on hepatic glucose metabolism related gene expression (A), hepatic glycogen content (B), and serum adiponectin content (C) in HFD/STZ-induced diabetic mice. Horizontal bars are median, upper, and lower edges of box are 75th and 25th percentiles; lines extending from box are minimum and maximum value. Values are significantly different between groups according to Student's *t*-test. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

당을 에너지로 사용하거나 글리코젠으로 저장하여 혈당을 감소시키는 당뇨병의 치료전략으로 사용되기도 한다(Kim 등, 2000). 이와 같이 HSB는 당뇨병 마우스 간조직의 Gk 유전자 발현을 높여 당의 분해 활성을 높이고 글리코젠으로 저장을 높임으로써 혈당개선에 기여하는 것으로 사료된다.

반면, 당대사 관련 유전자 중 G6pase와 Pepck는 간조직에서 당신생 과정을 조절하는 주요 인자이다(Barthel과 Schmoll, 2003). G6pase는 당신생 과정과 글리코젠 분해의 마지막 반응을 촉매하는 기능을 가지며, Pepck는 oxaloacetate가 phosphoenolpyruvate로 전환되는 반응을 촉진시켜 당신생을 유도한다(Jung, 2019). 본 연구에서도 HSB는 대조군에 비해 G6pase와 Pepck 유전자 발현을 유의적으로 낮추었다. Deng 등(2020a, 2020b)은 IR-HepG2 모델과 *db/db* 마우스에서 통보리 급여 시 G6pase와 Pepck의 유전자 발현이 낮아진다고 하였다. 이러한 결과는 본 연구결과와 유사하였다.

아디포넥틴은 지방조직에서 분비되는 아디포카인 중 하나로 당신생 관련 물질들을 낮추어 혈당을 감소시킨다고 알려져 있다(Byeon, 2010; Yamauchi 등, 2002). 또한 선행 임상연구들에서 아디포넥틴 수치가 높은 사람들에서 당뇨병 발병률이 낮다고 보고한 바 있어 아디포넥틴은 당뇨병 조절을 확인할 수 있는 매우 중요한 요소 중 하나로 알려져 있다(Spranger 등, 2003; Snehaltha 등, 2003). 따라서 본 연구에서도 혈청 아디포넥틴 함량을 측정한 결과, HSB는 대조군에 비해 아디포넥틴 농도가 유의적으로 높았다(Fig. 2C). 이는 zucker diabetic fatty 쥐에 보리 가루를 첨가하였을 때 혈청 아디포넥틴이 높아졌다는 Brockman 등(2013)

의 보고와 일치한다. 또한 Mohamed와 Padmanadhan (2019)은 비만 쥐에서 아디포넥틴을 높이는 보리의 주성분은 β -glucan이라 보고하였다.

이와 같이 HSB는 당의 글리코젠으로의 저장과 분해대사를 활성화하는 반면, 당신생 과정을 억제하여 혈당 강하에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 본 연구에 사용된 HSB는 약 11.3 mg gallic acid equivalent/g의 총 페놀성 화합물과 2.94 mg catechin equivalent/g의 총 플라보노이드 함량을 함유하고 있어 향후 당대사를 조절하는 보리의 주요 유효성분에 대한 추가 연구가 필요하다.

HSB 급여가 당뇨병 마우스의 체내 지질대사에 미치는 영향

제2형 당뇨병 환자의 경우 간으로 유리지방산의 유입이 증가하며, 유리지방산은 중성지질로 에스테르화되어 지질 축적이 이루어진다(Seo 등, 2018). 따라서 당뇨병에서 지질 대사 조절의 정상화는 치료에 있어 매우 중요하다(Nam 등, 2014). 본 연구에서 혈중 유리지방산과 중성지질은 HSB군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 총 콜레스테롤 농도는 두 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3A). 나아가 HSB는 간조직 내 콜레스테롤, 중성지질 및 유리지방산의 함량을 대조군에 비해 유의적으로 낮추었다(Fig. 3C)

혈청과 간조직의 지질 함량 변화는 간에서의 지질합성, 분해, 산화 등 다양한 대사 과정에 의해 조절된다(Jeon 등, 2017). 지질합성(lipogenesis)에 관여하는 전사인자인 Ppar γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)는 지방세포 분화과정 중 초기단계에 발현이 증가하여 중성 지방을 축적하는 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있

Fig. 3. Effects of HSB on serum lipid contents (A), hepatic H&E staining (B), and hepatic lipid levels (C) in HFD/STZ-induced diabetic mice. A, C: Horizontal bars are median, upper, and lower edges of box are 75th and 25th percentiles; lines extending from box are minimum and maximum value; B: magnification 200 $\times$. Values are significantly different between groups according to Student's *t*-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

며, 간조직에서 Ppar γ 유전자 발현은 지방산을 유발하는 요인이다(Gervois 등, 2000; Inoue 등, 2005). 흑수정찰백강주정추출물은 간에서 Ppar γ 유전자 발현을 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮추었으나 지질 합성 관련 유전자인 Fasn (fatty acid synthase)과 Srebf(sterol-regulatory element binding proteins)의 유전자 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 4A). 반면, HSB는 지방산 β -산화 관련 유전자인 Pgc1a(peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1a), Acs1l(acyl-CoA synthetase long chain family member 1), Cpt1a(carnitine palmitoyltransferase 1a)의 유전자 발현을 유의적으로 높였다(Fig. 4B). Acs1l은 Cpt1a와 상호작용하여 β -산화를 위해 지방산 아실-CoA 생성물을 미토콘드리아로 전달하는 기능을 하는 인자이며, Pgc1a 역시 지방산 산화를 유도하는 기능을 한다(Lee 등, 2011; Zhang 등, 2018). 이와 같이 HSB는 지질합성 전사인자인 Ppar γ 유전자 발현을 억제하고 지방산 산화 관련 유전자(Pgc1a, Acs1l, Cpt1a)들의 발현을 높여 간조직 내 지질 함량을 낮추고, 이는 지방구 분포와 크기 감소에 영향을 미친 것으로 사료된다(Fig. 3B).

HSB 급여가 당뇨병 마우스의 간조직내 염증대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향

당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 대표적 만성 염증질환으로 당뇨환자의 인슐린 저항성과 고인슐린 혈증은 염증반응과 관련이 있다고 알려져 있다(Shimobayashi 등, 2018). Yun 등(2011)은 제2형 당뇨 환자의 단핵구에서 염증성 인자인 interleukin-6(IL-6)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)가 높았으며 염증 관련 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF κ B)의 과발현을 보고하였다. 뿐만 아니라 염증성 사이토카인인 TNF- α 는 인슐린 저항성과 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있다(Akash 등, 2018). 따라서 염증대사 관련 유전자의 발현 억제는 당뇨 합병증을 억제하고 예방할 수 있는 좋은 치료 방안이 될 수 있다(Yun과 Surh, 2014). 따라서 HSB가 간조직의 염증 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, HSB는 염증대사 관련 유전자(Nfkb, Tnfa, Il6) 발현을 유의적으로 낮추었다(Fig. 5). Giriwono 등(2011)은 보리 발효추출물이 간손상 쥐에서 Tnfa, Il6 등의 염증관련 유전자 발현을 제어한다고 보고하였다. Uskokovic 등(2013)은 보리에 많이 함유되어 있는 β -glucan 추

Fig. 4. Effects of HSB on hepatic lipid metabolism related gene expression in HFD/STZ-induced diabetic mice. Horizontal bars are median, upper, and lower edges of box are 75th and 25th percentiles; lines extending from box are minimum and maximum value. Values are significantly different between groups according to Student's *t*-test. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

Fig. 5. Effects of HSB on hepatic inflammatory metabolism related gene expression in HFD/STZ-induced diabetic mice. Horizontal bars are median, upper, and lower edges of box are 75th and 25th percentiles; lines extending from box are minimum and maximum value. Values are significantly different between groups according to Student's *t*-test. ***P*<0.01, ****P*<0.001.

출물이 STZ로 유도한 당뇨병 쥐에서 NFκB 신호전달을 제어하여 염증반응을 억제하는 것으로 보고함에 따라 향후 NFκB/TNF-α 경로를 억제하는 HSB의 유효 성분에 관한 연구가 이루어져 할 것으로 생각한다. 그러나 본 연구를 통해 HSB가 당뇨병에서 높아지는 염증반응을 억제함으로써 당뇨병 합병증 예방에 관여할 수 있음을 보여주는 데 의의가 있다.

요 약

본 연구에서는 흑수정찰맥강 주정추출물(HSB)의 항당뇨 효과를 평가하기 위해 고지방식이와 스토렙토조토신으로 유도한 제2형 당뇨 마우스에서 고혈당, 지질대사 이상 및 염증 개선에 미치는 영향을 살펴보았다. HSB(200 mg/kg) 급여 4주차부터 혈당은 유의적으로 감소하였으며, 실험 종료 시 14%의 혈당 개선 효과를 보였다. HSB군 마우스의 췌장조직 β-세포는 크고 분명한 형태를 보였으며, 인슐린 염색도

진하였다. 혈청 중의 아디포넥틴의 농도도 HSB군에서 대조군보다 높았다. HSB는 당신생 관련 유전자인 G6pase와 Pepck의 유전자 발현을 낮춘 반면 Gk의 유전자 발현과 글리코겐 농도를 유의적으로 높였으며, 지방합성 관련 유전자인 Pparγ의 유전자 발현은 저해하였고 지방산 산화 관련 유전자인 Pgc1α, Acsl1, Cpt1α의 발현을 높여 당뇨병으로 인한 지질축적을 유의적으로 개선하였다. 또한 HSB는 염증 관련 유전자(Nfκb, Tnfa, Il6)의 발현도 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다. 이와 같이 본 연구는 처음으로 HSB의 당뇨병 동물모델에서 항당뇨 개선 효과 및 관련 기전을 유전자 수준에서 구명하였다. 향후 HSB의 유효 활성 성분에 대한 연구가 필요하나, 당뇨병 예방 및 개선 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ0135

2402)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor necrosis factor- α : role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem*. 2018. 119:105-110.
- Bae SH, Kim HS, Jong SK. Evaluation of external quality of polished barley. *Korean J Crop Sci*. 2009. 54:124-133.
- Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003. 285:E685-E692.
- Brockman DA, Chen X, Gallaher DD. Consumption of a high β -glucan barley flour improves glucose control and fatty liver and increases muscle acylcarnitines in the Zucker diabetic fatty rat. *Eur J Nutr*. 2013. 52:1743-1753.
- Byeon YS. The analysis of research about adiponectin. *J Korean Biol Nurs Sci*. 2010. 12:175-185.
- Carvalho DO, Curto AF, Guido LF. Determination of phenolic content in different barley varieties and corresponding malts by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Antioxidants*. 2015. 4: 563-576.
- Cha MN, Jun HI, Song GS, Kim YS. The effects of germination conditions on GABA and the nutritional components of barley. *Korean J Food Sci Technol*. 2012. 44:41-47.
- Choi CS. Pathogenesis of insulin resistance. *Korean J Med*. 2009. 77:171-177.
- Deng N, Guo R, Zheng B, Li T, Liu RH. IRS-1/PI3K/Akt pathway and miRNAs are involved in whole grain highland barley (*Hordeum vulgare* L.) ameliorating hyperglycemia of db/db mice. *Food Funct*. 2020a. 11:9535-9546.
- Deng N, Zheng B, Li T, Liu RH. Assessment of the phenolic profiles, hypoglycemic activity, and molecular mechanism of different highland barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Int J Mol Sci*. 2020b. 21:1175. <https://doi.org/10.3390/ijms21041175>
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957. 226:497-509.
- Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med*. 2000. 38:3-11.
- Giriwono PE, Shirakawa H, Hokazono H, Goto T, Komai M. Fermented barley extract supplementation maintained anti-oxidative defense suppressing lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011. 75:1971-1976.
- Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. 336:215-222.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Ninth edition 2019. Brussels, Belgium. 2019.
- Jeon JH, Kim B, Mun EG, Cha YS, Yu OK. Effects of fermented blueberry liquid in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *J Nutr Health*. 2017. 50:543-551.
- Jung UJ. Anti-diabetic effects of nobiletin in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48:515-523.
- Kalra S, Jood S. Effect of dietary barley β -glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rats. *J Cereal Sci*. 2000. 31:141-145.
- Kim MA, Son HU, Yoon EK, Choi YH, Lee SH. Comparison of anti-diabetic activities by extracts of grape cultivar. *Korean J Food Preserv*. 2012. 19:400-405.
- Kim MJ, Hyun JN, Kim JA, Park JC, Kim MY, Kim JG, et al. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *J Agric Food Chem*. 2007. 55:4802-4809.
- Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, et al. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem*. 2000. 279:30823-30829.
- Kim TY, Kim SJ, Imm JY. Improvement of blood glucose control in type 2 diabetic db/db mice using *Platycodon grandiflorum* seed extract. *Korean J Food Sci Technol*. 2020. 52: 81-88.
- Kim YK, Lee MJ, Kim KH, Park JH, Park TI, Yoon YM, et al. Waxy black barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar, 'Heuk-soojeongchal', with high yield and low amylose content. *Korean J Breed Sci*. 2018. 50:504-509.
- Korean Diabetes Association. Diabetes Fact Sheet in Korea 2020. Seoul, Korea. 2020.
- Lee K, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem*. 2011. 286:25655-25662.
- Lee MJ, Kim SH, Kim HS, Kim HY, Seo WD, Choi SW, et al. Production of γ -aminobutyric acid using the Korean hull-less barley bran with glutamate. *Korean J Crop Sci*. 2018. 63:35-40.
- Lee YT, Lee CK. Effects of varietal variation in barley on β -glucan and malting quality characteristics. *Korean J Food Sci Technol*. 1994. 26:172-177.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001. 25:402-408.
- Martyn JAJ, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: Etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology*. 2008. 109:137-148.
- Mohamed MK, Padmanadhan M. The modulating effect of barley β -glucan extract on high fat diet induced obesity - A biochemical study in albino wistar rats. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2019. 11:49-54.
- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990. 173:932-939.
- Nam MH, Koo YC, Hong CO, Yang SY, Kim SW, Jung HL, et al. *In vivo* study of the renal protective effects of *Capsosiphon fulvescens* against streptozotocin-induced oxidative stress. *Korean J Food Sci Technol*. 2014. 46:641-647.
- Park C, Yoon H. Blood glucose control and increase immunity effects of β -glucan added cooked barley noodle in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *J Korean Soc Complement Integr Med*. 2018. 6:89-98.
- Ramachandran S, Rajasekaran A, Adhirajan N. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic activity of *Terminalia paniculata* bark: an evaluation of possible phytoconstituents and mechanisms for blood glucose control in diabetes. *ISRN Pharmacol*. 2013. Article ID 484675. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/484675>
- Ramakrishna R, Sarkar D, Schwarz P, Shetty K. Phenolic linked anti-hyperglycemic bioactives of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars as nutraceuticals targeting type 2 diabetes. *Ind Crops Prod*. 2017. 107:509-517.
- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008. 118:2992-3002.

- Seifter S, Dayton S, Novic B, Muntwyler E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem.* 1950. 25: 191-200.
- Seo IB, Ahn SH, Kim KB. The effect of Bangpungtongsungsan on insulin resistance induced by non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Pediatr Korean Med.* 2018. 32(4):1-12.
- Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, et al. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2018. 128:1538-1550.
- Shin HK, Ryu CR. Effects of herb-combined remedy (HCR) on blood glucose levels and diabetic nephropathy in STZ-induced diabetic rats. *J Acupunct Res.* 2008. 25:115-125.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000. 106:171-176.
- Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care.* 2003. 26:3226-3229.
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet.* 2003. 361:226-228.
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005. 52:313-320.
- Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, Barnett AH. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *Lancet.* 2011. 378:182-197.
- Uskokovic A, Mihailovic M, Dinic S, Jovanovic JA, Grdovic N, Markovic J, et al. Administration of a β -glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Funct Foods.* 2013. 5:1966-1974.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002. 8:1288-1295.
- Yun JM, Jialal I, Devaraj S. Epigenetic regulation of high glucose-induced proinflammatory cytokine production in monocytes by curcumin. *J Nutr Biochem.* 2011. 22:450-458.
- Yun JM, Surh J. Anti-inflammatory activity of onion juice prepared from sulfur-fertilized onions in high glucose induced human monocytes. *Korean J Food Sci Technol.* 2014. 46:773-777.
- Zhang J, Wu H, Ma S, Jing F, Yu C, Gao L, et al. Transcription regulators and hormones involved in the development of brown fat and white fat browning: transcriptional and hormonal control of brown/beige fat development. *Physiol Res.* 2018. 67:347-362.
- Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018. 14:88-98.