

청미래덩굴잎 추출물 용매분획의 항산화, 항당뇨 및 항비만 활성연구*

강윤환¹ · 이영실³ · 김경곤² · 김대중¹ · 김태우¹ · 최 먼^{1,2§}

강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터,¹ 강원대학교 생명건강공학과,²
명지대학교 농생명바이오식의약소재개발사업단³

Study on antioxidative, antidiabetic and antiobesity activity of solvent fractions of *Smilax china* L. leaf extract*

Kang, Yun Hwan¹ · Lee, Young-Sil³ · Kim, Kyoung Kon² · Kim, Dae Jung¹ · Kim, Tae Woo¹ · Choe, Myeon^{1,2§}

¹Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

²Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

³Center for Nutraceutical and Pharmaceutical Materials, Myongji University, Yongin 449-728, Korea

ABSTRACT

Smilax china L., a native plant found in Asian countries, has several medicinal properties including antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer effects. Although the root of the plant is commonly used as traditional herbal medicine in Korea and China, the medicinal properties of the leaves have not gained the same attention. In this study, we analyzed the antioxidant activity, α -glucosidase inhibitory effect and lipid accumulation inhibition effect of *Smilax china* L. leaf water extract (SCLE) and its solvent fractions. SCLE was fractionated by using a series of organic solvents, including ethylacetate (EA) and n-butanol (BuOH). The EA fraction had the highest total polyphenol content (440.20 ± 12.67 mg GAE/g) and total flavonoid content (215.14 ± 24.83 mg QE/g). The radical scavenging activity IC_{50} values of the EA fraction for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) were 0.022 mg/mL and 0.13 mg/mL, respectively. Further, SOD-like activity and reducing power values of the EA fraction were higher than those of the other fractions. However, both the α -glucosidase and lipid accumulation inhibition assays showed that the BuOH fraction ($83.35 \pm 4.18\%$ at 1 mg/mL) and water extract ($11.27 \pm 2.67\%$) were more effective than the EA fraction ($64.13 \pm 6.35\%$, and $45.66 \pm 7.20\%$). These results provide new insights into the potential anti-diabetic and anti-obesity effects of *Smilax china* L. leaf. (J Nutr Health 2013; 46(5): 401 ~ 409)

KEY WORDS: *Smilax china* L., anti-diabetic activity, anti-obesity activity, antioxidant, organic solvent fraction.

서 론

전세계적으로 경제성장을 통한 경제적 여유와 생활수준의 향상은 식·생활습관의 서구화를 이끌었고 의료과학의 성장은 고령화 사회를 만들었으며, 복잡해진 사회구조는 각종 스트레스의 증가를 유도하였다. 이런 사회적 발전과정을 거치면서 인간은 대사성 질병인 당뇨병에 지속적으로 시달리고 있으며 점차 그 피해자는 늘어나고 있다.¹⁾ 최근의 당뇨병 유병률은 폭발적으로 증가하고 있으며, 많은 연구결과를 분석한 자료에 의하면 2030년에는 전세계적으로 3억 6천만 명 이상이

될 것으로 예상되고 있다. 당뇨의 유병률 증가는 질환의 특성상 심각한 합병증을 유발하여 삶의 질을 저하시키며 사망률을 높인다는데 있다. 뿐만 아니라 그 결과로 의료관련 사회적 비용을 크게 증가시킨다는 점에서 그 심각성이 사회경제적 사안이 될 수 있다.²⁾

당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환으로 췌장 β 세포의 파괴로 인해 인슐린이 결핍되는 제 1형 당뇨병과 인슐린이 비정상적으로 분비 되거나 말초 조직에서 인슐린 저항성을 나타내는 제 2형 당뇨병으로 분류되며, 우리나라의 경우 전체 당뇨병환자의 90% 이상이 제 2형 당뇨병인 것으로 알려져 있다.³⁾

Received: Sep 6, 2013 / Revised: Oct 6, 2013 / Accepted: Oct 17, 2013

*This work was supported by grants of Well-being Bioproducts Regional innovation Center project (B0009702).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

© 2013 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

당뇨환자의 경우 식후 혈중 당과 인슐린 농도가 비정상적으로 급격히 높게 상승하는데, 지속적인 고혈당은 망막, 신장, 신경과 같은 기관에 합병증을 초래한다. 그러나 현재까지 당뇨의 근원적 치료방법은 개발되어 있지 않은 실정이며, 혈당치를 정상적인 수준으로 유지하는 것이 최선의 치료 방법으로 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾ 다양한 혈당강하제 중 α -glucosidase inhibitor 인 acarbose, voglibose 등은 소장에서 탄수화물 분해를 억제시켜 섭취한 탄수화물의 분해를 지연시킴으로써 식후 혈중 당 농도의 급격한 상승을 막을 수 있다.⁷⁾ 하지만 이런 합성 혈당 강하제는 저혈당의 위험이 높고 복부팽창, 부글거림, 설사 등의 부작용이 나타날 수 있다.⁸⁾ 따라서 최근 당뇨병 치료약제의 부작용을 극복하기 위해서 생약재를 소재로 하는 당뇨병 예방 및 치료보조제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.⁹⁾

항당뇨 효능의 생약재 연구에서 먼저 확인이 필요한 효능은 항산화 활성이라 할 수 있다. 산화스트레스는 안정적인 상태에서 활성산소종의 생성이 증가되어 있는 것을 말하며, 이는 유리 라디칼 생성이 증가하거나 항산화 방어기전이 저하된 경우에 발생한다.¹⁰⁾ 이전의 많은 연구에서 당뇨환자에서는 유리 라디칼 제거를 위한 superoxide dismutase (SOD) 효소가 비정상적으로 활성화 되어 있고 항산화물질인 reduced glutathione, α -tocopherol이 감소되어있어 산화스트레스에 노출되어있음이 확인되었다.¹¹⁾ 이는 고혈당에 의한 포도당 자가산화, 최종당화산물의 생성과 폴리올 경로의 활성화 등 여러 가지 기전에 의해 나타나는 산화스트레스 유발작용 때문인 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 그 외에 당뇨병 환자에서 증가되는 유리지방산과 렙틴 또한 ROS의 생성에 기여하며, 이렇게 증가된 산화스트레스는 β 세포의 기능장애를 유발하여 인슐린의 분비장애를 일으키기도 한다.^{10,12)}

생약재의 항당뇨 효능연구에서 직접적인 혈당강하작용 외에 확인이 필요한 효능으로 항비만 효과가 있다. 최근의 많은 연구를 통해 비만세포에서의 지질분해와 유리 지방산이 당뇨의 원인이 되기도 하며 인슐린을 이용한 당뇨치료과정에서 동반되는 고인슐린혈증에 의해 비만이 더욱 심해지기도 한다는 보고가 있었다.^{10,13)} 따라서 생약재의 혈당강하효능과 함께 항비만 효능은 당뇨의 예방과 치료 및 부작용을 줄일 수 있는 중요한 요소가 될 것이다.

청미래덩굴 (*Smilax china* L.)은 아시아지역의 야산에 널리 분포하는 활엽덩굴성 관목으로 한의학에서 그 뿌리를 토복령이라 하여 전통의약소재로 오랜 세월 동안 사용하였으며, 이뇨, 체력증강, 통풍, 류마티즘 등에 효과가 있는 것으로 보고되었다.¹⁴⁾ 그러나 그 외에 대한 연구는 거의 이루어진 바가 없다가 최근의 연구를 통해 청미래덩굴잎의 항균력과 항산화력이 알려지게 되었으며, 특히 α -tocopherol 수준의 항산

화력을 갖는 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside와 kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside가 분리되어 연구된 바 있다.¹⁵⁾

그러나 이러한 청미래덩굴의 우수한 항산화활성이 확인되었음에도 유효 효능에 대한 구체적인 연구결과는 진행된 바가 거의 없는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 청미래덩굴잎의 물 추출물과 그 분획을 이용하여 항산화 활성, α -glucosidase 활성저해 효과 및 3T3-L1 지방세포분화 억제 효과를 확인함으로써 nutraceuticals 소재로서의 가능성을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시 료

실험에 이용된 청미래덩굴잎은 경상남도 의령지역에서 채집하여 신흥목교수 (동국대학교 한의과대학)에 의해 검수된 것을 사용하였으며, 건조 후 각각 마쇄한 뒤 무게 당 10배의 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출하고 filter paper로 여과한 다음 감압 농축 후 동결건조한 것을 시료로 사용하였다. 극성별 용매분획은 물 추출 분말을 다시 물에 녹이고 같은 양의 hexane과 혼합하여 분획하고, 물 층은 다시 dichloromethane으로 분획하고, 다시 물 층은 ethyl acetate로 분획하고, 남은 물 층은 마지막으로 n-butanol로 분획하여 최종 물 층과 함께 5개의 분획을 확보하였다. 그 중 hexane과 dichloromethane 분획물은 극소량이어서 실험에서 제외하고 ethyl acetate, n-butanol 그리고 최종 물 분획을 실험에 사용하였다. 본 실험의 구성에서 청미래덩굴 잎 물추출물 (SCLE)를 대조물질로 사용하고 ethyl acetate 분획 (SCLE/EA), n-butanol 분획 (SCLE/BuOH) 그리고 최종 물 분획 (SCLE/FW)을 시험물질로 사용하였다.

세포주 배양

비만세포 분화실험의 모델시스템인 3T3-L1 preadipocyte를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)로부터 구입하여 10% bovine calf serum (Welgene, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin (Welgene, Daegu, Korea)이 첨가된 dulbecco's modified eagle's medium (Welgene, Daegu, Korea) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 10% fetal bovine serum (Welgene, Daegu, Korea)가 포함된 DMEM배지로 교환한 후 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.25 μ M dexamethasone (DEX), 10 μ g/mL의 insuline (이하 MDI)을 처리하여 adipogenesis를 유도하고 청미래덩굴잎 추출물 및 분획물에

의한 항비만 활성을 분석하였다.¹⁶⁾

세포독성 (Cell cytotoxicity) 측정

세포독성은 Yadav 등이 사용한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 응용하여 측정하였다.¹⁷⁾ 3T3-L1 세포를 96-well tissue culture plate에 1×10^4 cells/well로 100 μ L씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 배지에 청미래덩굴잎과 분획을 농도별로 제조한 후 세포에 처리한 후 24시간 동안 37°C에서 배양 하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 10 μ L MTT시약 (5 mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 형성된 formazan에 DMSO 100 μ L를 첨가한 후 shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 ELISA microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (Control)의 흡광도 값을 기준으로 세포독성을 비교하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 이용하여 측정하였다.¹⁸⁾ 각 시료 0.2 mL과 증류수 4.8 mL, 50% Folin-Ciocalteu's phenol (Sigma, Missouri, USA) 0.5 mL을 잘 혼합하여 3분간 반응시킨 후 1 mL의 10% Na₂CO₃를 첨가하여 암조건에서 1시간동안 반응시킨 다음 UV/vis spectrophotometer를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 함량은 galic acid (Sigma, Missouri, USA) 검량선을 이용하여 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법을 응용하여 측정하였다.¹⁹⁾ 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL이 든 test tube에 각 시료 0.5 mL를 혼합하여 실온에서 40분간 반응 시킨 다음 UV/vis spectrophotometer (Optizen 2120UV)(Mecasys, Daejeon, Korea)를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 화합물의 함량은 quercetin (Wako, Osaka, Japan) 검량선을 이용하여 산출하였다.

항산화 활성 측정

DPPH radical 소거능은 Kim 등이 사용한 Blois법을 활용하여 측정하였다.²⁰⁾ 각 분획물을 농도별 (0.1, 0.25, 0.2, 1 mg/mL)로 증류수를 이용하여 희석한 시료와 0.2 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)를 1 : 1로 혼합한 후 실온 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Negative control은 증류수를 넣어 측정하고, positive control은 ascorbic acid를 사용하여 아래 radical scavenging activity 계산식에 의거하여 소거활성을 측정하였다. 이때 IC₅₀

은 negative control 값에 대비하여 50% 감소시키는 추출물의 농도를 나타내었다.

ABTS radical 소거능은 Re 등의 방법을 응용하여 측정하였다.²¹⁾ 7 mM의 ABTS와 140 mM의 potassium persulfate를 첨가하여 암소에서 24시간 반응한 후, 734 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.02 이 되도록 EtOH로 희석하였다. 희석된 ABTS 980 μ L와 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL으로 희석한 각각의 시료 20 μ L를 혼합하고, 상온에서 3분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Negative control은 증류수를 넣어 측정하고, positive control은 ascorbic acid를 사용하여 다음 계산식에 의거하여 소거활성을 측정하였다. 이때 IC₅₀은 DPPH와 동일한 방법으로 계산하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= 100 - [(absorbance\ value\ of\ sample / absorbance\ value\ of\ control) \times 100]$$

SOD 유사활성 측정은 Jeong과 Kim이 사용한 Marklund와 Marklund의 방법을 응용하여 측정하였다.²²⁾ 농도별로 준비된 시료 용액 2 mL에 Tris-HCl buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol (Sigma, Missouri, USA) 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시키고 spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율 (%)로 나타내었다.

$$SOD-like\ activity\ (\%) = 100 - [(S_{Abs} - B_{Abs}) / C_{Abs}] \times 100]$$

S_{Abs}: Absorbance at 420 nm determined with test sample

B_{Abs}: Absorbance at 420 nm determined with dH₂O instead of pyrogallol

C_{Abs}: Absorbance at 420 nm determined with dH₂O instead of test sample

환원력은 Hue 등이 사용한 Oyaizu의 방법을 응용하여 측정하였다.²³⁾ 농도별로 준비된 시료 용액 0.5 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 0.5 mL, 1% potassium ferricyanide 0.5 mL를 각각 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였다. 위 반응액을 650 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.5 mL를 새 튜브에 옮긴 후에 증류수 0.5 mL, 1% FeCl₃ 0.1 mL를 가하여 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 반응액의 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. 높은 흡광도가 강한 환원력을 나타낸다.

α -Glucosidase 활성억제능 측정

청미래덩굴 잎과 그 분획물의 α -glucosidase 활성억제능은 Ryu 등이 사용한 방법을 응용하여 측정하였다.²⁴⁾ 농도별로 준비된 각각의 추출물 50 μ L에 1 mM p-nitrophenyl- α -D-glucospyranoside (pNPG) 50 μ L를 첨가하고 0.02 units α -glucosidase 50 μ L를 첨가 후 37°C에서 일정시간 동안 반응시키고 2 M NaOH 100 μ L를 첨가하여 반응을 종결시켜 substrate인 pNPG로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 spectrophotometer를 사용하여 405 nm에서 측정하여 α -glucosidase 활성억제력을 측정하였다. 실험의 대조군으로는 α -glucosidase 저해제로 알려진 acarbose (Sigma, Missouri, USA)를 사용하였다. 실험은 30분 반응시간동안 농도에 따른 억제능 변화 또는 0.25 mg/mL 농도에서 시간에 따라 활성변화 측정을 진행하였으며 아래 계산식에 의거하여 활성을 산출하였다.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibition (\%)} = [1 - (C_{\text{Abs}} - S_{\text{Abs}}) / (C_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}})] \times 100$$

C_{Abs} : 대조구 흡광도

S_{Abs} : 시료 흡광도

B_{Abs} : 시료 무첨가구 흡광도

Oil-red O staining을 통한 지방세포 분화 및 lipid accumulation 측정

3T3-L1 preadipocyte의 adipocyte로의 분화는 상기의 MDI를 처리하여 유도하였다. 96-well tissue culture plate에 1×10^4 cells/well개의 세포를 분주하고 100% confluent 상태까지 배양한 후 MDI가 든 배지로 교체하면서 시료를 종류별로 처리하고 시료를 계속 유지하면서 분화를 유도하였다. 위 치상 현미경을 이용하여 지방세포 분화 정도 및 시료에 의한 분화 억제능을 관찰하여 촬영한 후 Oil-red O staining을 통해 지방세포 분화 억제능 및 lipid accumulation을 분석하였다. 분화가 완료된 세포를 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 씻어준 다음 10% formalin으로 1시간동안 고정한다. 차가운 PBS로 3회 씻어준 후 Oil-red O staining solution을 처리하여 1시간동안 염색하고 차가운 PBS로 2회 씻어준 후 100% isopropanol을 사용하여 염색된 지방을 추출하고 ELISA microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (Statistical Package for Social Sciences) program을 이용하여 Mean \pm SD로 표시하였고, one-way ANOVA test 후 Duncan's mul-

tipule range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

청미래덩굴잎 물 추출물 및 분획물의 제조

본 실험에 사용한 청미래덩굴잎 물 추출물 및 용매분획의 제조과정은 Fig. 1에 제시된 바와 같다. 음건한 청미래덩굴잎 500 g의 물 추출 결과 약 52.12 g의 추출분말을 확보하였으며 그 수율은 10.4%였다. 40 g의 물 추출물로부터 얻은 각 분획물의 양은 hexane, dichloromethane, ethylacetate, n-butanol, H₂O 층이 각각 0.22, 0.64, 8.72, 11.83, 16.91 g으로 그 수율은 0.55, 1.6, 21.8, 29.6, 42.3%로 나타났다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

SCLE와 그 분획의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 확인 결과는 Fig. 2와 같다. 폴리페놀의 정량을 위해 galic acid (GA)를 이용하여 검량선 ($R^2 = 0.9993$)을 작성하고 이에 따라 총 폴리페놀의 함량을 계산하였다. SCLE 및 그 분획인 SCLE/EA, SCLE/BuOH 및 SCLE/FW의 폴리페놀함량은 각각 127.93 ± 9.47 GAE/g, 440.20 ± 12.67 GAE/g, 289.53 ± 8.81 GAE/g, 68.87 ± 8.03 GAE/g이었으며 SCLE/EA에서 가장 많은 함량이 확인되었다. 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 검량선 ($R^2 = 0.9990$)을 작성하고 이에 따라 총 플라보노이드 함량을 산출하였다. 그 결과 SCLE 및 그 분획인 SCLE/EA, SCLE/BuOH 및 SCLE/FW의 플라보노이드 함량은 각각 41.99 ± 5.59 QE/g, 215.14 ± 24.83 QE/g, 124.46 ± 10.62 QE/g, 8.48 ± 4.00 QE/g이었으며 폴리페놀함량과 같이 SCLE/EA에서 가장 많은 함량의 플라보노이드가 확인되었다.

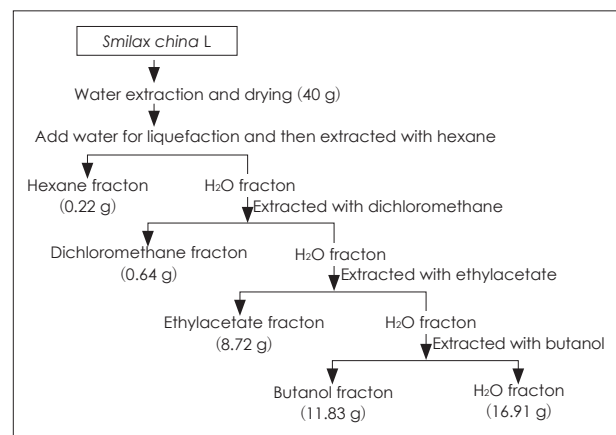


Fig. 1. Extraction and fractionation of *Smilax china* L. leaf extracts (SCLE) by using various solvents.

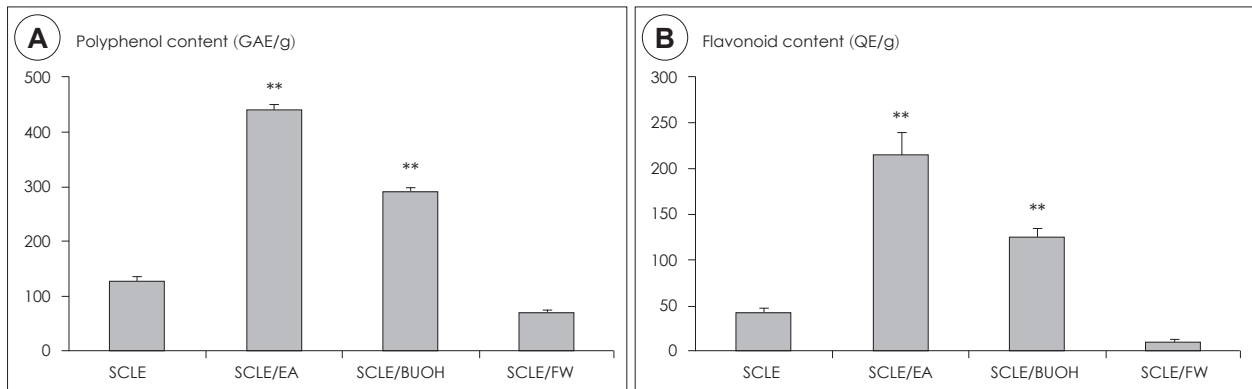


Fig. 2. Total polyphenol content (A) and total flavonoid content (B) of SCLE fractions. Garlic acid and quercetin were used as standard compounds for the measurement of polyphenol and flavonoid contents respectively. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments. **: $p < 0.001$ as compared to the SCLE.

SCLE 및 그 분획의 radical scavenging activity

SCLE 및 그 분획의 radical scavenging activity를 확인한 결과 DPPH radical scavenging activity는 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 positive control로 사용된 ascorbic acid는 88.25 ± 0.16 , 98.67 ± 0.21 , 98.53 ± 0.16 , $98.53 \pm 0.08\%$ 의 활성을 나타냈으며 SCLE는 23.53 ± 1.76 , 61.26 ± 1.02 , 90.47 ± 0.43 , $95.70 \pm 0.21\%$, SCLE/EA는 71.60 ± 2.47 , 95.42 ± 0.29 , 96.65 ± 0.08 , $96.60 \pm 0.00\%$, SCLE/BuOH는 53.01 ± 1.83 , 90.94 ± 1.85 , 95.04 ± 0.00 , $95.42 \pm 0.08\%$, SCLE/FW는 10.41 ± 0.64 , 32.91 ± 1.23 , 59.00 ± 1.93 , $92.92 \pm 0.74\%$ 을 나타내었다 (data not shown). SCLE/EA가 가장 높은 활성을 가지고 있었으며, 그 다음으로 SCLE/BuOH, SCLE, SCLE/FW 순으로 활성을 나타내었다. ABTS radical scavenging activity를 확인한 결과 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 positive control로 사용된 ascorbic acid는 40.57 ± 0.21 , 95.26 ± 0.96 , 98.37 ± 0.16 , $99.30 \pm 0.50\%$ 의 활성을 나타냈으며 SCLE는 9.70 ± 0.16 , 23.86 ± 1.29 , 46.84 ± 1.11 , $81.56 \pm 1.99\%$, SCLE/EA는 41.13 ± 2.63 , 86.79 ± 1.21 , 99.48 ± 0.08 , $99.39 \pm 0.08\%$, SCLE/BuOH는 23.95 ± 0.50 , 55.10 ± 2.15 , 95.21 ± 0.79 , $98.88 \pm 0.24\%$, SCLE/FW는 9.47 ± 3.03 , 13.69 ± 0.57 , 26.60 ± 0.63 , $46.75 \pm 0.42\%$ 을 나타내었다 (data not shown). DPPH radical scavenging activity와 같이 SCLE/EA가 가장 높은 활성을 가지고 있었으며, 그 다음으로 SCLE/BuOH, SCLE, SCLE/FW 순으로 활성을 나타내었다. IC_{50} 을 확인한 결과 Table 1과 같이 DPPH radical scavenging activity의 경우 SCLE/EA가 0.022 mg/mL으로 가장 높게 관찰되었고 SCLE/FW가 0.479 mg/mL으로 가장 낮게 관찰되었으며, ABTS radical scavenging activity의 경우 SCLE/EA가 0.13 mg/mL으로 가장 높게 관찰되었고 SCLE/FW가 1.082 mg/mL으로 가장 낮게 관찰

Table 1. IC_{50} value¹⁾ of SCLE fractions for DPPH and ABTS

Sample	IC_{50} (mg/mL)	
	DPPH	ABTS
SCLE	0.231 ± 0.080	0.584 ± 0.063
SCLE/EA	$0.022 \pm 0.001^{a2)}$	0.130 ± 0.015^a
SCLE/BuOH	0.088 ± 0.032^b	0.237 ± 0.022^b
SCLE/FW	0.479 ± 0.067	1.082 ± 0.104

1) IC_{50} value is the concentration of sample required for 50% inhibition 2) Values with different superscripts are significant increase at the same column ($p < 0.05$)
Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments

되었다.

SCLE 및 그 분획의 SOD-like activity

SCLE 및 그 분획의 SOD-like activity를 pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 측정된 결과 Fig. 3와 같다. SOD-like activity를 확인한 결과 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 positive control로 사용된 ascorbic acid는 32.28 ± 2.84 , 50.39 ± 2.49 , 69.44 ± 4.01 , $80.47 \pm 1.18\%$ 의 활성을 나타냈으며 SCLE는 3.62 ± 2.01 , 7.25 ± 2.06 , 10.68 ± 0.57 , $15.07 \pm 0.87\%$, SCLE/EA는 20.22 ± 3.35 , 22.51 ± 5.64 , 27.86 ± 4.99 , $34.54 \pm 5.19\%$, SCLE/BuOH는 18.12 ± 2.29 , 19.84 ± 0.99 , 27.09 ± 1.84 , $32.63 \pm 1.84\%$, SCLE/FW는 2.67 ± 1.71 , 6.29 ± 0.33 , 9.16 ± 1.74 , $12.78 \pm 2.01\%$ 을 나타내었다. Ascorbic acid와 비교하여 낮은 활성이지만 SCLE/EA가 가장 높은 활성을 가지고 있었으며, 그 다음으로 SCLE/BuOH, SCLE, SCLE/FW 순으로 활성을 나타내었다.

SCLE 및 그 분획의 reducing power

SCLE와 그 분획의 reducing power를 측정된 결과 Table 2와 같다. Reducing power를 확인한 결과 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 positive control로 사용된 ascorbic acid

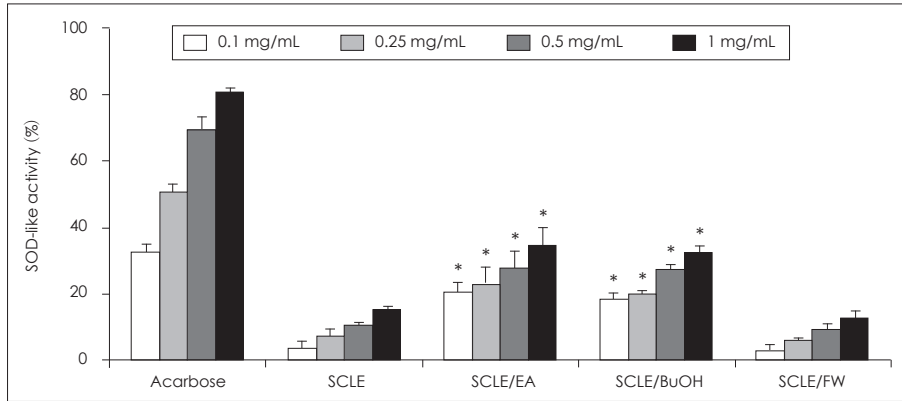


Fig. 3. SOD-like activity of SCLE fractions. SOD-like activity assay was performed by using a range of SCLE concentrations. Ascorbic acid was used as positive control. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments. *: $p < 0.05$ as compared to the SCLE.

Table 2. Reducing power of SCLE fractions

Samples	Reducing power (absorbance, 700 nm)		
	0.1 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL
Acarbose ¹⁾	0.028 \pm 0.001	1.341 \pm 0.012	3.079 \pm 0.027
SCLE	0.047	0.217 \pm 0.004	0.381 \pm 0.008
SCLE/EA	0.154 \pm 0.001 ^{a2)}	0.581 \pm 0.020 ^b	1.239 \pm 0.017 ^c
SCLE/BuOH	0.116 \pm 0.001 ^a	0.464 \pm 0.009 ^b	0.870 \pm 0.059 ^c
SCLE/FW	0.014	0.0927	0.179 \pm 0.003

1) Positive control 2) Values with different superscripts are significant increase at the same row ($p < 0.05$). Each value is expressed as Mean \pm SD in triplicate experiments

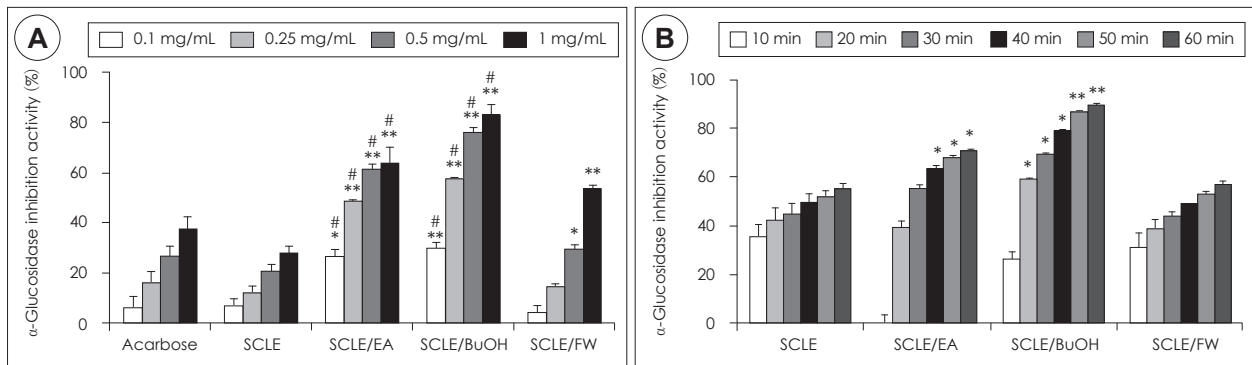


Fig. 4. Anti-diabetic activity of SCLE fractions. α -Glucosidase inhibitory activity assay was performed using a range of concentrations (incubation time, 30 min)(A) and time-points (concentration, 0.25 mg/mL)(B). Acarbose was used as positive control. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ as compared to the SCLE. # $p < 0.001$ as compared to the acarbose.

는 0.028 \pm 0.001, 1.341 \pm 0.012, 3.079 \pm 0.027의 흡광 값을 나타냈으며 SCLE는 0.047 \pm 0.000, 0.217 \pm 0.004, 0.381 \pm 0.008, SCLE/EA는 0.154 \pm 0.001, 0.581 \pm 0.020, 1.239 \pm 0.017, SCLE/BuOH는 0.116 \pm 0.001, 0.464 \pm 0.009, 0.870 \pm 0.059, SCLE/FW는 0.014 \pm 0.000, 0.093 \pm 0.000, 0.179 \pm 0.003을 나타내었다. Ascorbic acid와 비교하여 낮은 활성이지만 SCLE/EA fraction이 가장 높은 활성을 가지고 있었으며, 그 다음으로 SCLE/BuOH, SCLE, SCLE/FW 순으로 활성을 나타내었다.

α -Glucosidase 활성억제 효능

SCLE와 그 분획의 α -glucosidase 활성억제 실험결과는 Fig. 4와 같다. 농도에 따른 α -glucosidase 활성억제능을 측정 한 결과 α -glucosidase 억제제로 시판중인 acarbose의 활성은 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL에서 6.30 \pm 4.78, 16.36 \pm 4.45, 26.68 \pm 4.19, 37.79 \pm 4.89%의 활성을 나타내었으며, SCLE는 7.28 \pm 2.73, 12.16 \pm 2.89, 21.02 \pm 2.99, 27.98 \pm 3.22%, SCLE/EA는 26.81 \pm 3.07, 49.05 \pm 0.57, 61.55 \pm 2.32, 64.13 \pm 6.35%, SCLE/BuOH는 30.09 \pm 2.06, 57.87 \pm 0.44, 75.97 \pm 2.51, 83.35 \pm 4.18%, SCLE/FW는 4.66 \pm 2.61, 14.85 \pm

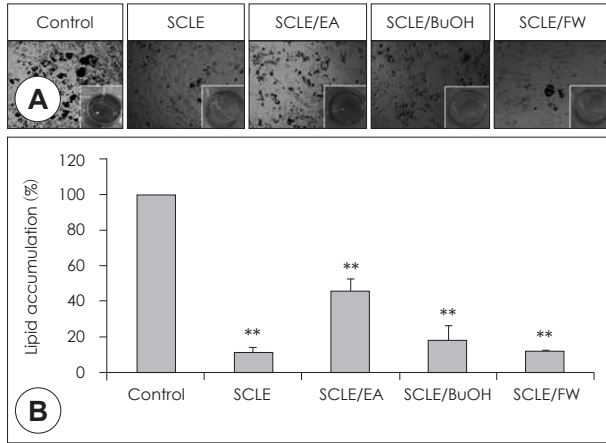


Fig. 5. Effects of SCLE fractions on lipid accumulation. 3T3-L1 adipocytes were stained with Oil-Red O for 1 hr. Stained oil droplets were dissolved in isopropanol and quantified by spectrophotometric analysis at 500 nm. Results are expressed as Mean \pm SD of three independent experiments and each sample was measured in triplicate. **: $p < 0.001$ as compared to the control.

1.29, 29.89 \pm 1.48, 54.10 \pm 1.02%을 나타내었다 (Fig. 5A). SCLE를 제외하면 ascorbic acid와 비교하여 분획에서 높은 활성이 관찰되었으며, 항산화기능과 달리 SCLE/BuOH가 가장 높은 활성을 가지고 있었으며, 그 다음으로 SCLE/EA, SCLE/FW, SCLE 순으로 활성을 나타내었다. 1 mg/mL을 기준으로 비교하였을 때 SCLE/BuOH는 acarbose보다 2배 이상의 활성을 나타내었다.

시간에 따른 SCLE 및 그 분획물의 α -glucosidase 활성억제를 확인한 결과 10, 20, 30, 40, 50, 60분에서 SCLE는 35.31 \pm 5.51, 42.39 \pm 5.23, 45.14 \pm 4.12, 49.74 \pm 3.32, 51.76 \pm 2.57, 55.23 \pm 2.20%, SCLE/EA는 0, 39.52 \pm 2.36, 55.16 \pm 1.65, 63.75 \pm 1.31, 67.96 \pm 1.07, 71.14 \pm 0.86%, SCLE/BuOH는 26.49 \pm 2.91, 59.10 \pm 0.72, 69.78 \pm 0.18, 79.22 \pm 0.47, 86.99 \pm 0.54, 89.91 \pm 0.59%, SCLE/FW는 31.10 \pm 6.27, 39.04 \pm 4.01, 44.17 \pm 1.76, 49.29 \pm 0.23, 53.34 \pm 0.66, 57.20 \pm 1.21%을 나타내었다. 시간 변화에 따른 활성의 증가를 확인할 수 있었으며, SCLE/BuOH에서 가장 높은 활성이 관찰되었다.

SCLE 및 그 분획의 adipogenesis에 미치는 영향

SCLE 용매분획의 항비만 활성을 관찰하기 위해 SCLE, SCLE/EA, SCLE/BuOH 및 SCLE/FW를 이용하여 3T3-L1 preadipocyte의 세포 독성을 먼저 관찰하였다. 그 결과 SCLE 및 분획들에서 1 mg/mL까지 독성이 관찰되지 않았으며, 3T3-L1 분화실험은 안전한 범위인 0.5 mg/mL에서 진행하였다 (data not shown).

추출물 및 각 분획물이 MDI에 의한 지방세포로의 분화 및 지방 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 Fig. 5B와 같다.

시료의 처리가 없는 control과 비교하여 추출물 및 그 분획들은 명확히 지방세포 분화를 억제하는 것이 관찰되었으며, 그 중 SCLE에서 가장 높은 억제효과가 확인되었다. 그 다음으로 SCLE/FW, SCLE/BuOH, SCLE/EA 순서로 억제효과가 관찰되었다. Lipid accumulation을 확인한 결과 SCLE, SCLE/EA, SCLE/BuOH, SCLE/FW에서 각각 11.27 \pm 2.67, 45.66 \pm 7.20, 18.13 \pm 7.80, 11.88 \pm 0.99%가 확인되었으며, 항산화 활성이 가장 높았던 SCLE/EA에서 가장 낮은 억제 효능이 관찰되었다.

고찰

본 실험에서 SCLE 및 그 분획의 항산화 활성을 확인한 결과 radical scavenging activity, SOD-like activity, reducing power에서 SCLE/EA가 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. 이는 Fig. 2의 폴리페놀 및 플라보노이드함량 측정결과와 같은 결과이며 폴리페놀 및 플라보노이드함량과 항산화력에 대한 상관관계를 설명한 Jeong 등과 같은 결과라 판단된다.²⁵⁾

당뇨병을 치료하는 약물과 치료기전은 다양하게 알려져 있다. 본 연구에서는 그 중 소장 소화효소를 억제하여 분해되는 단당류의 양을 감소시켜 소장에서 흡수되는 당을 감소시킴으로써 혈관 내 급격한 당의 증가를 막는 α -glucosidase inhibitor를 발굴하고자 실험을 진행하였다. 현재 α -glucosidase inhibitor로 알려져 시판되고 있는 당뇨병 치료제는 acarbose, voglibose, miglitol이 있으며 그 외 다수의 천연물 유래 추출물 및 미생물 유래의 대사산물이 판매되고 있다. 그러나 이러한 α -glucosidase inhibitor의 부작용으로 복부팽만, 설사 등의 알려지면서 안전하고 효과적인 천연물 탐색연구가 진행되고 있다.^{8,26)}

본 실험에서 SCLE 및 그 분획을 이용하여 α -glucosidase inhibition 효과를 확인한 결과 SCLE 보다 분획에서 더 높은 활성을 나타냈으며 시판제품인 acarbose 보다 높은 활성을 나타내었다. 특히 SCLE/BuOH는 1 mg/mL에서 acarbose 활성의 2배 이상 높은 효능을 가지고 있었다. 이는 앞의 실험에서 확인한 SCLE/EA의 높은 항산화 활성과 다른 것으로 SCLE/BuOH에 α -glucosidase inhibition 유효 성분이 포함되어 있을 가능성을 시사한다.

인슐린을 이용한 당뇨의 치료과정에서 어쩔 수 없이 고인슐린혈증이 수반되며 이는 비만을 유발한다고 알려져 있다.²⁷⁾ 또한 제 2형 당뇨병환자의 75%가 비만인 것으로 보고되며 비만 당뇨병환자의 경우 혈관질환을 합병증의 발병률이 높고 그로 인한 치사율도 높은 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 뿐만 아니라 비만 환자에게서 만성적 고혈당단계 이전에 인슐린저항성이 관찰

된다. 물론 이것은 고혈당에 의한 산화스트레스에서 유발되는 인슐린 저항성과는 다르지만 비만과 당뇨가 강한 상관관계를 가진다는 것을 의미한다.¹⁰⁾ 그리고 비만과 고혈당 환자에게서 증가하는 free fatty acids의 함량은 산화스트레스를 유발하여 인슐린저항성 및 췌장 β 세포의 기능이상을 유발하기도 한다.^{10,29)} 따라서 생약재의 혈당강하효능과 함께 항비만효능은 당뇨의 예방과 치료 및 부작용을 줄일 수 있는 중요한 요소가 될 것이다.

본 실험에서 SCLE 및 그 분획을 이용한 3T3-L1 preadipocyte의 adipocyte로의 분화 억제활성 실험을 진행한 결과 SCLE 및 그 분획이 강한 억제능력을 가지는 것으로 확인되었으며, 특히 SCLE와 SCLE/FW에서 높게 관찰되었다. 이는 SCLE 및 그 분획이 항비만 효과를 통한 당뇨개선 및 예방효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

본 실험의 결과를 통해 당뇨의 예방 및 치료를 위해 기본적으로 선행되어야 하는 생체 내 산화적 스트레스를 감소시키기 위한 항산화 작용과 소장 내 당흡수를 저해할 수 있는 α -glucosidase inhibition 효능, 당뇨에 의한 혈관합병증의 발병을 증가시키는 비만 예방효과를 관찰함으로써 SCLE의 항당뇨 및 항비만 효능을 과학적으로 규명하는 기초자료를 확보할 수 있었으며, SCLE의 새로운 기능과 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

그러나 아직 고농도 당 조건에서의 비만세포에 미치는 효과 및 adipokine 분비 등과 SCLE 작용기전의 유의적 관계 등에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구에서 SCLE와 그 분획의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정된 결과 SCLE/EA에서 가장 많은 함량이 확인되었으며, DPPH 및 ABTS radical scavenging activity, SOD-like activity, reducing power 측정을 통한 항산화 활성을 비교한 결과도 폴리페놀과 플라보노이드함량 측정 결과와 마찬가지로 SCLE/EA에서 높은 활성을 명확하게 확인할 수 있었다. 그리고 SCLE 및 분획의 항당뇨 효능을 α -glucosidase 활성억제능을 측정함으로써 비교한 결과 항산화력과 달리 SCLE/BuOH에서 가장 높은 활성을 확인할 수 있었으며, 1 mg/mL 기준으로 acarbose의 α -glucosidase 활성억제능과 비교하여 2배 이상의 활성을 관찰할 수 있었다. 또한 당뇨와 비만의 강한 관련성이 알려진 상황에서 SCLE 및 그 분획의 3T3-L1 세포 분화 억제능력을 확인한 결과 SCLE와 SCLE/FW에서 가장 강한 억제효과를 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 SCLE가 다방면에서 당뇨의 개선과 예방을 위해

효능을 나타낼 수 있음을 확인하였고, 이는 SCLE가 neutraceuticals 소재로서의 개발가치가 높음을 시사한다.

Literature cited

- 1) King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21(9): 1414-1431
- 2) Kim SG, Choi DS. Epidemiology and current status of diabetes in Korea. *Hanyang Med Rev* 2009; 29(2): 122-129
- 3) Choi YY, Sohn HS, Shin HT. Clinical benefits of self-monitoring of blood glucose in non-insulin treated patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Korean J Clin Pharm* 2010; 20(3): 183-192
- 4) Toeller M. Diet therapy of diabetes mellitus. *Fortschr Med* 1991; 109(2): 41-42, 45
- 5) Koivisto VA. Insulin therapy in type II diabetes. *Diabetes Care* 1993; 16 Suppl 3: 29-39
- 6) Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 2001; 286(10): 1218-1227
- 7) Derosa G, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 2012; 8(5): 899-906
- 8) Standl E, Schnell O. Alpha-glucosidase inhibitors 2012 - cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diab Vasc Dis Res* 2012; 9(3): 163-169
- 9) Heo SJ, Hwang JY, Choi JI, Han JS, Kim HJ, Jeon YJ. Diphloroethoxyhydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2009; 615(1-3): 252-256
- 10) Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23(5): 599-622
- 11) Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 2002; 321(1-2): 89-96
- 12) Kim BH, Son SM. Mechanism of developing diabetic vascular complication by oxidative stress. *J Korean Endocr Soc* 2006; 21(6): 448-459
- 13) Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, Lim GE, Chu KY, Hu X, Botezelli JD, Asadi A, Hoffman BG, Kieffer TJ, Bamji SX, Clee SM, Johnson JD. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab* 2012; 16(6): 723-737
- 14) Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY. Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35(9): 1133-1138
- 15) Cha BC, Lee EH. Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. *Korean J Pharmacogn* 2007; 38(1): 31-36
- 16) Choi SS, Cha BY, Iida K, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. Artepillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Biochem Pharmacol* 2011; 81(7): 925-933
- 17) Yadav D, Chaudhary AA, Garg V, Anwar MF, Rahman MM, Jamil SS, Khan HA, Asif M. In vitro toxicity and antidiabetic activity of a newly developed polyherbal formulation (MAC-ST/001) in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Protoplasma*

- 2013; 250(3): 741-749
- 18) Kim JM, Baek JM, Kim HS, Choe M. Antioxidative and anti-asthma effect of *Morus* bark water extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010; 39(9): 1263-1269
 - 19) Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 2000; 71(1-2): 109-114
 - 20) Kim KH, Kim NY, Kim SH, Han IA, Yook HS. Study on antioxidant effects of fractional extracts from *Ligularia stenocephala* leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012; 41(9): 1220-1225
 - 21) Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-1237
 - 22) Jeong KY, Kim ML. Physiological activities of *Ulmus pumila* L. extracts. *Korean J Food Preserv* 2012; 19(1): 104-109
 - 23) Hue SM, Boyce AN, Somasundram C. Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in the leaves of different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Aust J Crop Sci* 2012; 6(3): 375-380
 - 24) Ryu HW, Lee BW, Curtis-Long MJ, Jung S, Ryu YB, Lee WS, Park KH. Polyphenols from *Broussonetia papyrifera* displaying potent alpha-glucosidase inhibition. *J Agric Food Chem* 2010; 58(1): 202-208
 - 25) Jeong HJ, Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim HJ. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. *Korean J Food Sci Technol* 2010; 42(5): 571-577
 - 26) Lee JM, Park JH, Chu WM, Yoon YM, Park E, Park HR. Antioxidant activity and alpha-glucosidase inhibitory activity of stings of *Gleditsia sinensis* extracts. *J Life Sci* 2011; 21(1): 62-67
 - 27) 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(3): 400-405
 - 28) Lee HJ, Park KY. Body weight, cardiovascular risk factors, and self-efficacy of diabetic control among obese type II diabetic patients. *J Korean Acad Nurs* 2005; 35(5): 787-797
 - 29) de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 2008; 54(6): 945-955