



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

고과당 식이 흰쥐에서 누리장나무  
(*Clerodendrum trichotomum*)  
추출물의 인슐린 저항성 및  
지질이상혈증 개선효과

제주대학교 대학원

생물학과

오 정 민

2020년 8월

고과당 식이 흰쥐에서 누리장나무  
(*Clerodendrum trichotomum*)

추출물의 인슐린 저항성 및  
지질이상혈증 개선효과

지도교수 김 세 재

오 정 민

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2020년 6월

오정민의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 선 령 

위 원 고 희 철 

위 원 김 세 재 

제주대학교 대학원

2020년 6월

Improving Effect of *Clerodendrum  
trichotomum* Extract against Insulin  
Resistance and Dyslipidemia in  
High-Fructose Dieted Rat

Jung-Min Oh

(Supervised by professor Se-Jae Kim)

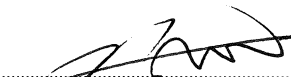
A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for  
the degree of Master of Science


2020. 6.

This thesis has been examined and approved.

Sun Ryung Lee 

Chairperson of the Committee

Hee Chul Ko 

SE JAE KIM 

(Name and signature)

Jun 2020

Date

Department of biology  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

Metabolic syndrome refers to a condition that includes metabolic disorders such as decreased glucose tolerance, dyslipidemia, hypertension, and obesity. Although the cause of metabolic syndrome is still unclear, insulin resistance is being evaluated as a key factor underlying its onset. Insulin resistance can cause various diseases, including hyperlipidemia, diabetes, cardiovascular disease, and obesity. *Clerodendron trichotomum* leaves have been used in Korean folk remedies to treat high blood pressure, migraine headaches, and malaria. In the present study, we investigated the effects of *C. trichotomum* extract on metabolic syndrome. Among the plant tissues, the *C. trichotomum* leaves extract (CTE) showed the highest total polyphenol contents ( $219.5 \pm 4.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) and antioxidant activities, such as 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activities ( $\text{IC}_{50} = 33.7 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) scavenging activities ( $\text{IC}_{50} = 34.3 \pm 10.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), and superoxide scavenging activities ( $\text{IC}_{50} = 23.8 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Therefore, the subsequent animal experiment was performed using CTE in a high fructose diet animal model. Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups: 46% high carbohydrate diet group (HC), 60% high fructose diet group (HF), and 60% high fructose diet with CTE (500 mg/kg/day) in drinking water (CT); the indicated diets were administered for 16 weeks. The blood glucose and insulin levels were analyzed and found to be significantly lower in the CT group compared with the HF group. Additionally, the insulin resistance (HOMA-IR) was improved in the CT group compared with the HF group. The serum triglyceride, total cholesterol, and low-density

lipoprotein cholesterol contents of CT group decreased, and high-density lipoprotein cholesterol content increased comparing with those of HF group. Histological examination of liver tissue using hematoxylin & eosin staining, and immunohistochemical staining against TNF- $\alpha$  revealed that lipid accumulation and inflammatory response were significantly reduced by CTE administration. Western blot analysis using the liver tissue showed that CTE reduced the expressions of sterol regulatory element-binding protein (SREBP-1) and fatty acid synthetase (FAS). In addition, CTE increased the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK), which is involved in the oxidation of fatty acid. Taken together, these results indicated that CTE improved the fatty liver, hyperlipidemia, and insulin resistance induced by a high fructose diet in rats. Altogether, this study suggests that CTEs could be a useful natural preparation for preventing metabolic disorder.

Key Words: *Clerodendron trichotomum*, Hyperlipidemia, Hyperglycemia, Insulin resistance, Metabolic syndrome

# 목 차

A B S T R A C T	-----	i
목 차	-----	iii
LIST OF TABLE	-----	vi
LIST OF FIGURES	-----	vii
I. 서 론	-----	1
II. 재 료 및 방 법	-----	3
1. 시료 채집 및 추출물 제조	-----	3
2. 총 폴리페놀 함량 분석	-----	3
3. HPLC 분석	-----	4
4. 항산화 활성 분석	-----	4
1) DPPH 소거 활성	-----	4
2) ABTS 소거 활성	-----	5
3) Superoxide 소거 활성	-----	5
5. 동물사육 및 시료 투여	-----	6
6. 혈액 채취 및 조직 적출	-----	7

7. 내당능 검사 및 인슐린 농도 측정 .....	7
8. 혈청의 생화학적 분석 .....	7
9. 간 조직 관찰 .....	8
10. 면역조직화학 염색(Immunohistochemistry, IHC) .....	8
11. Western blot .....	9
12. 통계처리 .....	10
<b>III. 결 과</b> .....	<b>11</b>
1. 누리장나무 조직별 항산화 활성 및 식물화합물 특성 .....	11
2. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 체중감소 효과 .....	15
3. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 지질이상혈증 개선 효과 .....	17
4. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 혈당 강하 및 인슐린 저항성 개선 효과 .....	19
1) 혈당강하 .....	19
2) 내당능개선 .....	21
3) 혈청 인슐린 농도 감소 및 인슐린 저항성 개선 .....	23
5. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 간 기능 개선 효과 .....	25
1) 혈청 GOP 및 GPT 활성 .....	25
2) 간의 조직학적 변화 관찰 .....	27
6. 고과당 식이 흰쥐 간조직의 단백질 발현에 미치는 CTE의 영향 .....	29



IV. 고찰	-----	31
V. 참고 문헌	-----	35
VI. 요약	-----	42

## LIST OF TABLES

Table 1. Compositions of experimental diets .....	6
Table 2. Total polyphenol contents and anti-oxidant activities of the extracts derived from <i>Clerodendrum</i> <i>trichotomum</i> tissues. ....	13
Table 3. Body weight, food intake, water intake in various experimental groups. ....	16

## LIST OF FIGURES

Figure 1. HPLC chromatogram and 2D contour of verbascoside in CTE. ....	14
Figure 2. The serum lipid contents in various experimental groups. ....	18
Figure 3. The levels of fasting blood glucose in various experimental groups. ....	20
Figure 4. The oral glucose tolerance test in various experimental groups. ....	22
Figure 5. The serum insulin level(A) and HOMA-IR(B) in various experimental groups. ....	24
Figure 6. The serum GOT(A) and GPT(B) levels in various experimental groups. ....	26
Figure 7. Microscopic examinations of liver tissues in various experimental groups. ....	28
Figure 8. The expressions of AMPK, FAS, SREBP-1 in the liver tissues of various experimental groups. ....	30

## I. 서 론

당대사 이상, 복부비만, 고지혈증, 고혈압 등 질환 증후가 동시다발성으로 나타나는 경우를 대사증후군(Syndrome X)이라고 명명하였다(Reaven, 1988). 그 후 병리학적으로 인슐린 저항성과 관련이 있어 인슐린저항성증후군(Insulin resistance syndrome)이라고 불리기도 하였으나 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서 1998년에 이를 대사증후군(Metabolic syndrome)으로 정의하였다(Alberti 등., 1998). 대사증후군은 인종에 따라 기준치가 다르게 적용되지만, 일반적으로 복부비만, 고중성지방혈증, 고밀도-콜레스테롤 저하와 고혈압, 인슐린 저항성 중 3가지 이상이 동시다발성으로 나타나는 상태를 의미한다. 이러한 대사 장애 발달은 요통, 심혈관계 및 뇌혈관 질환, 관절염, 당뇨병 등의 만성 퇴행성 질환 발생을 증가시키고, 이로 인한 사망위험률을 증가시킬 수 있다(Expert 등., 2001).

인간의 평균 수명은 계속 연장되고 있고, 고령화 및 노인 인구의 증가로 인하여 암, 심장질환, 뇌혈관질환 등으로 인한 만성 퇴행성질환 관련 사망률은 증가되고 있다(통계청, 주요 사망원인별 사망률 추이, 2019). 대사증후군 유병률은 2001년 29.2%, 2005년 30.4%, 2007년 31.3%로 계속적으로 증가되는 추세이다(Lim 등., 2011). 2015년도 국민영양조사결과에 의하면 성인의 지방섭취는 증가하는데 비해 신체활동이 감소로 이상지질혈증과 비만이 증가하였고, 성인들 중 72.2%가 대사증후군 위험인자를 1개 이상 보유하고 있는 것으로 나타났다. 하지만 현대인들의 서구화된 식습관, 생활습관, 정신적 스트레스 및 평균수명의 증가에 따라 대사증후군 유병률은 지속적으로 증가할 것으로 예견된다(Jeong 등., 2016; Seong 등., 2018; Han 등., 2013).

인슐린 저항성은 대사증후군의 핵심적인 요인으로 평가되고 있으며(이윤정 등., 2012), 간, 근육 및 지방조직에서 정상적인 인슐린 농도 상태에서 인슐린 작용의 결함을 동반한다. 또한, 포도당을 조직 내로 운반수송 및 이용하는 기능이 저하로 인해 췌장 베타세포에서는 인슐린 분비가 증가 되어 혈장 인슐린 농도가 증가한다(Choi, 2009). 이러한 상태에서는 지방세포에 저장된 중성지방

이 분해되어 방출됨으로서 혈액 내 유리지방산(free fatty acid, FFA) 농도가 증가하게 된다. FFA는 간에서 포도당 생성 증가와 중성지방 합성을 촉진하여 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)의 분비를 증가시킨다. 그리고 FFA는 근육에서 포도당의 효율적인 이용을 방해하여 인슐린 감수성을 감소시킨다. 따라서 인슐린 저항성은 비만을 비롯하여 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 심혈관질환을 일으키는 핵심적인 요인으로 강조되고 있다(Cersosimo 등., 2006; Kim 등., 2006; Eckel 등., 2010; Cornier 등., 2008).

누리장나무(*Clerodendrum trichotomum* Thunb)는 마편초과(Vebena-case)에 속하는 낙엽관목(落葉灌木)으로 높이가 2m에 이르고, 가지에 털이 없다. 한국, 중국, 필리핀과 일본 북부지방 등의 바닷가, 계곡, 산록에 분포되어 있고 우리나라에서는 강원도 및 황해도 이남의 산록, 계곡 또는 바닷가에서 자란다(Park 등., 2007, Kim 등., 2017). 누리장나무의 어린 가지와 잎은 풍사를 몰아내고 습사를 없애며, 혈압을 낮추는 약효로 고혈압치료제, 진정제, 진통제, 항류마티스제, 소염제 등의 약물치료 효과를 가지며 취오동(臭梧桐), 명목단수(冥牧丹樹), 해주상산(海州常山), 해동(海桐)이라는 한약재로 불려 왔다. 민간에서는 고혈압, 편두통, 이질, 류마티스 등에 치료제로 사용되어왔다(Choo 등., 2015). 누리장나무는 항산화, 항염, 항균작용(전홍신 등., 2017; Oh 등., 2014; 홍성진 등., 2018)외에도 고지혈증과 같은 대사질환 억제효과 등의 생리활성을 가진다고 보고되었다(Shrivastava 등., 2007). 본 연구는 고과당 식이로 유도한 대사증후군 흰쥐 모델에서 누리장나무 에탄올 추출물이 인슐린 저항성, 지질 이상혈증 개선 효과를 평가하기 위하여 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 채집 및 추출물 제조

본 연구에 사용된 누리장나무는 2018년 7월 제주도 북부지역 조천읍 신촌리 부근에서 채집하였다. 채집한 누리장나무는 부위별로 잎, 가지, 꽃, 꽃가지 4가지의 부위로 구분하여 세척 하고 60℃에서 24시간 건조 후 분쇄하였다. 분쇄한 시료 100 g에 70% 에탄올 1 L를 첨가하여 24시간 동안 상온에서 추출한 후 여과지(Advantec, Japan)로 여과하고 회전농축기(Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)를 사용하여 40℃에서 농축하였다. 농축액은 동결건조기(SFDSM 24L, 삼원냉열엔지니어링, Korea)를 사용하여 건조한 후 분말상태로 균질화하여 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

### 2. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Folin 등., 1915)을 일부 변형하여 측정하였다. 시료(10 mg/mL) 500  $\mu$ L에 동량의 2N Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma, Missouri, USA) 시약을 첨가하여 5분간 반응하고 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sigma, Missouri, USA) 시약 2 mL을 첨가하여 실온에서 90분 동안 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 Gallic acid (Sigma, Missouri, USA)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 이용하여 산출하였다.

### 3. HPLC 분석

누리장나무 에탄올 추출물의 식물화합물의 조성은 HPLC system (Waters Corp., Milford, MA)으로 분석하였다. 추출물의 지표물질로서 verbascoside (Sigma, Missouri, USA)을 사용하였고, 장비운영과 데이터처리는 엠펜소프트웨어를 사용하였다. Verbascoside의 분리는 Sunfire column으로 실행하였고 330 nm에서 모니터링 하였다. 컬럼온도는 40도를 유지하였다. Verbascoside의 함량분석을 위한 이동상의 구성은 MeCN(A)과 증류수(B)를 사용하였다. 이동상 용리는 0.8 mL/min의 유량으로 초기 10% A로 시작하여 30분에 걸쳐 100% A로 증가시켰고 5분 동안 유지한 후 1분에 걸쳐 10%로 감소시켰다. 그리고 6분 동안 유지시켰다. Verbascoside은 메탄올과 DMSO로 희석하였고 10 µL (10 mg/mL) 씩 주입하였다. 추출물 내 verbascoside는 표준물질의 머무름 시간과 UV spectra를 비교하여 동정하였다.

### 4. 항산화 활성 분석

#### 1) DPPH 소거 활성

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, Missouri, USA) 소거 활성은 Blois의 방법(Blois, 1958)으로 측정하였다. DPPH 소거활성은 96 well plate에 메탄올에 희석시킨 시료(12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL)를 100 µL씩 넣고 0.4 mM DPPH용액을 동량 첨가하여 빛을 차단한 상태로 10분간 반응한 후 517 nm 흡광도를 측정하여 다음 식으로 산출하였다.

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (1 - (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}) \times 100$$

$A_{\text{Sample}}$ : Sample의 흡광도(Sample + DPPH + MeOH)

$A_{\text{Blank}}$ : Blank의 흡광도(Sample + MeOH)

$A_{\text{Control}}$ : Control의 흡광도(DPPH + MeOH)

## 2) ABTS 소거 활성

2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS; Sigma, Missouri, USA) 소거 활성을 측정하기 위하여 7 mM ABTS와 2.45 mM ammonium persulphate (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea)를 동량 혼합하여 24시간동안 자유라디칼을 생성시켰다. ABTS 소거활성은 에탄올에 희석시킨 시료(12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL) 100 µL에 동량의 ABTS 용액을 첨가하여 빛을 차단한 상태로 10분간 방치한 후 732 nm 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = (1 - (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}) \times 100$$

$A_{\text{Sample}}$ : Sample의 흡광도(Sample + ABTS + EtOH)

$A_{\text{Blank}}$ : Blank의 흡광도(Sample + EtOH)

$A_{\text{Control}}$ : Control의 흡광도(ABTS + EtOH)

## 3) Superoxide 소거활성 분석

superoxide 소거활성은 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)에 희석한 시료를 50 µL씩 분주한 후 0.3 mM nitro blue tetrazolium (NBT; Sigma, Missouri, USA)와 1 mM xanthine (Sigma, Missouri, USA), 2 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA ; Bio-rad, California, USA) 가 포함된 기질을 동량으로 첨가한 후 100 µL xanthine oxidase(50 mU/mL, Sigma, Missouri, USA)를 혼합하여 상온에서 20분간 반응한 후 550 nm 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{Superoxide scavenging (\%)} = (1 - (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}) \times 100$$

$A_{\text{Sample}}$ : Sample의 흡광도(Sample + 기질 + Xanthine oxidase)

$A_{\text{Blank}}$ : Blank의 흡광도(Sample + Sodium phosphate buffer)

$A_{\text{Control}}$ : Control의 흡광도(Sodium phosphate buffer + 기질 + Xanthine oxidase)



## 5. 동물사육 및 시료 투여

누리장나무 에탄올 추출물이 대사증후군에 미치는 영향은 흰쥐 모델을 이용하여 평가하였다. 동물실험은 제주대학교 동물연구윤리위원회의 승인(승인번호 : 2019-0008)을 받은 후 수행하였다. 4주령 수컷 Sprague Dawley Rat (Orient, Gyeonggi-do, Korea)로부터 구입하여 일반사료와 물을 자유롭게 공급하면서 3주간 적응시켰다. 동물들은 무작위로 2마리씩 나누어 일정한 온도(23±2℃)와 습도(55±5%), 그리고 명암주기(12시간)를 유지하며 사육하였다. 3주간 적응기를 거친 동물들은 무작위로 10마리씩 3군으로 나누어 16주간 실험을 진행하였다. 고탄수화물 식이군(HC)은 46% 탄수화물이 함유된 사료를, 고과당 식이군(HF)은 60% 과당이 함유된 사료를 주문 제작하여 식이하였다 (Dooyeol Biotech, seoul, Korea). 고과당 식이군은 멸균수를 음용수로 제공하였고, 누리장나무 추출물 처리군(CT)은 고과당 식이와 더불어 CTE (500 mg/kg/day)를 음용수에 녹여 투여하였다(Table 1).

**Table 1. Compositions of experimental diets**

Ingredient	(단위:g/kg diet)		
	HC	HF	CT
Casein	200	207	207
DL-methionine	3	3	3
Corn Starch	397.48	0	0
Fructose	0	600	600
Lard	0	50	50
Maltodextrin	62.51	0	0
Sucrose	0	0	0
Soybean oil	70	0	0
Cellulose	219.49	79.81	79.81
AIN 93G Mineral Mix	35	0	0
AIN 93G Vitamin Mix	10	0	0
Choline Bitartrate	2.5	0	0
TBHQ	0.014	0	0
Rogers-Harper Mineral Mix	0	50	50
Zinc Carbonate	0	0.04	0.04
Vitamin Mix 40060	0	10	10
Drinking water	Water	Water	Water containing CTE (500 mg/kg/day)

## 6. 혈액 채취 및 조직 적출

실험종료 후 실험동물을 CO<sub>2</sub>로 마취하여 개복 후 심장으로 부터 전혈하고 실온에서 30분간 방치하였다. 그 후 응고된 혈액을 12,000 × g로 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 -70℃에서 보관하였다. 간 조직은 해부 즉시 적출하여 1 × PBS (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea)로 세척 후 무게를 측정 한 후 액체 질소에 넣어 급속냉동 시킨 후, 실험에 사용할 때까지 -70℃에 보관 하였다.

## 7. 내당능 검사 및 인슐린 농도 측정

내당능 측정을 위해 실험동물을 12시간 이상 금식시킨 후 glucose (2 g/kg, Sigma, Missouri, USA)을 경구 투여하였다. 실험동물의 혈당은 투여 후 0, 30, 60, 90, 120분 간격으로 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당검사측정기(OSANG Healthcare, Gyeonggi-do, Korea)로 측정하였다. 혈청 인슐린 농도는 Mercodia Rat Insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden)를 사용하여 측정하였다. 인슐린 저항성의 지표인 HOMA-IR (Homeostasis model assessment of Insulin resistance)은 공복 혈당과 공복 인슐린 값으로부터 다음 계산식으로 산출하였다(Matthews, 1985).

$$\text{HOMA-IR} = [\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting insulin (U/L)}] / 22.5$$

## 8. 혈청의 생화학적 분석

혈청 중성지방 농도는 Triglyceride quantification assay kit (Do gen bio, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였고, 혈청 총 콜레스테롤 농도는 Total cholesterol assay kit (Do gen bio, seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈청 HDL/LDL - 콜레스테롤 농도는 효소법에 의해 정량되는 High-density

lipoprotein/Low-density lipoprotein cholesterol assay kit (HDL/LDL; Do gen bio, seoul, Korea)을 사용하여 측정하였다. 그리고 혈청 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성 측정 kit (Asan pharm, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 측정하였다.

## 9. 간 조직 관찰

간 조직을 관찰하기 위하여 10% Neutral buffered formalin (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea) 혹은 4% Paraformaldehyde (Biosesang, Gyeonggi-do, Korea)으로 24h 동안 고정 후, 1 × PBS로 washing 후 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올에서 순차적으로 탈수하고 xylene (Junsei, Tokyo, Japan)으로 파라핀을 침투하여 파라핀 블록을 만들었다. 파라핀 블록은 회절박절기 (microtome, Leica BIOSTSTEMS, Korea)를 이용하여 7 μm 크기로 박절한 후 슬라이드 글라스에 부착시켜 실온에서 건조하였다. 탈파라핀화 과정은 조직이 붙어있는 슬라이드를 xylene 용액에 넣어 진행한 후, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%의 에탄올 순으로 함수과정을 거치고 흐르는 물에 수세한 뒤 증류수로 세척하여 Hematoxylin & Eosin 염색하였다. 염색이 끝난 슬라이드는 탈수과정을 거쳐 Canada balsam (Junsei, Tokyo, Japan) 3 방울을 떨어뜨려 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

## 10. 면역조직화학 염색(Immunohistochemistry, IHC)

간 조직의 TNF- $\alpha$ 에 대한 면역조직화학적 분석은 파라핀 블록을 이용하여 수행하였다. 간 조직 절편이 붙어있는 슬라이드를 xylene에 넣어 1시간 동안 탈파라핀화 한 후, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올에서 순차적으로 함수하고 흐르는 물에 10분 수세한 뒤 증류수로 5분씩 2회 세척하였다. 그 후 0.01M sodium citrate buffer (pH6.0, Sigma, Missouri, USA)를 95°C로 끓이고 조직을 20분간 반응하였다. 조직의 과산화효소 활성은 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 20분

간 상온에서 반응하여 불활성화시킨 후 증류수로 세척하였다. Oil pen으로 조직 주변으로 원을 그려준 후 0.1% PBS-T [1 × PBS/0.1% Tween20 (Amresco, Ohio, USA)]를 이용하여 5분간 1회 세척 후 1 × PBS로 5분간 2회 세척하였다. 이 후 1.5% normal goat serum을 처리하여 45 분간 실온에서 blocking 하고 TNF- $\alpha$  antibody (abcam, Cambridge, UK)를 1:500으로 희석한 후 4°C 암실에서 24시간 동안 반응하였다. 슬라이드를 PBS-T로 5분간 1회, 1 × PBS로 2회 세척한 후 Vectastain ABC kit (Vector laboratories, California, USA)의 2차 항체(biotinylated anti Rabbit IgG)로 45분간 상온에서 반응시킨 후 PBS-T로 5분간 1회, 1 × PBS로 2회 세척하였다. 그 후 Avidin-Biotin Complex (ABC) reagent를 이용하여 상온에서 45분간 반응하고 PBS-T로 5분간 1회, 1 × PBS로 2회 세척한 후 DAB peroxidase substrate kit (Vector laboratories, California, USA)를 이용하여 발색하였다. 발색이 끝나면 1 × PBS로 세척하고 증류수로 10분간 세척하였다. Hematoxylin으로 핵 염색을 한 후 흐르는 물에 10분간 세척한 뒤 70%, 80%, 90%, 95% 에탄올에서 5초씩, 100% 에탄올에서 5분간 탈수하였다. 그 후 xylene에 10분 반응 후 슬라이드를 canada balsam을 이용하여 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

## 11. Western blot

간 조직의 단백질을 분리하기 위하여 lysis buffer [1 × RIPA (Millipore, Darmstadt, Germany), 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; Sigma, Missouri, USA), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma, Missouri, USA), 1 mM NaF (Merck, Darmstadt, Germany), 1 µg/mL aprotinin (Amresco, Ohio, USA), 1 µg/mL pepstatin (Amresco, Ohio, USA), 1 µg/mL leupeptin (Millipore, Darmstadt, Germany)]에서 간 조직을 균질화하고 12,000 × g로 원심분리 하여 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-rad, California, USA)를 이용하여 정량하였다. 단백질은 6~10%의

SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 100 V에서, 120 분 동안 전기영동 후 PVDF (poly-vinylidene difluoride) membrane (Millipore, Darmstadt, Germany)에 200 mA로 120 분간 전이하였다. 단백질이 전이된 membrane은 5% BSA (Bovogen, Keilor East, Australia)로 4°C에서 하룻밤동안 blocking 하였다. 1차 항체반응은 FAS antibody (1:5,000, Santa cruz, California, USA), SREBP-1 (1:2,000, Santa Cruz, California, USA), AMPK (1:2,000, Santa cruz, California, USA), p-AMPK (1:2,000, Santa cruz, California, USA),  $\beta$ -actin (1:10,000, Santa cruz, California, USA)을 이용하여 2시간 반응하였고, 1차 항체반응이 끝난 membrane은 0.01% T-TBS용액으로 5분씩 6회 세척 후 peroxidase-conjugate된 2차 항체 (Vector laboratories, California, USA)를 상온에서 1시간 반응시킨 후 0.02% T-TBS로 5분씩 6회 세척하였다. 그 후 Westar ETA C (Cyanagen, Bologna, Italia)를 이용하여 단백질을 X-ray필름 (Agfa Gevaert N.V., Septestaat 27, Belgium)으로 검출하였다.

## 12. 통계처리

모든 실험 결과는 평균(mean) $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었고, 일원배치 분산 분석(ANOVA)으로 분석 후 Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  일 때 유의성 있는 값으로 판단하였다. 통계처리는 SPSS 프로그램을 사용하였으며, 모든 그래프는 SigmaPlot 12.0 (Systat Software, California, USA) 프로그램을 사용 작성하였다.

### III. 결 과

#### 1. 누리장나무 조직별 항산화 활성 및 식물화합물 특성

누리장나무 조직별에 따른 생리활성을 비교하기 위하여 각 조직의 폴리페놀 함량과 항산화 활성을 분석하였다. 잎, 가지, 꽃, 꽃가지를 사용해서 제조한 에탄올 추출물들의 폴리페놀 함량, DPPH radical, ABTS radical, 그리고 xanthine에서 파생되는 superoxide radical 소거활성들을 측정하였다. 이들의 항산화 활성은 생성된 해당 free radical 중 50%가 소거되는 시료 농도(IC<sub>50</sub> 값)로 환산하여 표시하였다(Table 2). DPPH radical 소거 활성은 잎 추출물(IC<sub>50</sub> = 33.1±1.7 µg/mL)이 가장 우수하였고, 다음은 꽃 추출물(IC<sub>50</sub> = 45.15±1.04 µg/mL), 가지 추출물(IC<sub>50</sub> = 106.0±2.0 µg/mL), 꽃가지 추출물(IC<sub>50</sub> = 157.4±10.1 µg/mL) 순이었다. ABTS radical 소거 활성 또한 잎 추출물(IC<sub>50</sub> = 34.3±10.3 µg/mL)이 가장 높았고, 꽃 추출물(IC<sub>50</sub> = 56.9±19.5 µg/mL), 가지 추출물(IC<sub>50</sub> = 88.9±22.0 µg/mL), 꽃가지 추출물(IC<sub>50</sub> = 150.2±29.9 µg/mL) 순으로 나타났다. 그리고 xanthine에서 유래되는 superoxide radical 소거 활성 또한 잎 추출물(IC<sub>50</sub> = 24.8±2.3 µg/mL)에서 가장 높았다. 누리장나무 잎 에탄올 추출물(CTE)은 양성대조군인 butylated hydroxyl anisole(BHA), quercetin, allopurinol 등의 항산화 활성에는 미치지 못하는 못하지만, 다른 조직에 비교해 항산화 활성이 가장 우수하였다. 항산화 활성과 비례관계에 있다고 알려진 총 폴리페놀 함량을 gallic acid (GA)를 표준물질로 사용하여 분석하였다. 그 결과, 누리장나무 부위별 총 폴리페놀 함량은 잎 추출물(219.2±4.5 mg GA/g extract), 꽃 추출물(178.7±4.5 mg GA/g extract), 가지 추출물(80.5±1.7 mg GA/g extract), 꽃가지 추출물(60.1±3.6 mg GA/g extract) 순으로 나타났다. CTE의 식물화합물 조성을 HPLC 방법으로 분석한 결과, 가장 풍부하게 함유된 식물화합물은 verbascoside인 것으로 동정되었다(Figure 1). HPLC 크로마토그램에서 verbascoside의 머무름 시간은 15.476 분이었고, PDA 검출기에서 330.3 및 218 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. Chromatogram 상에서

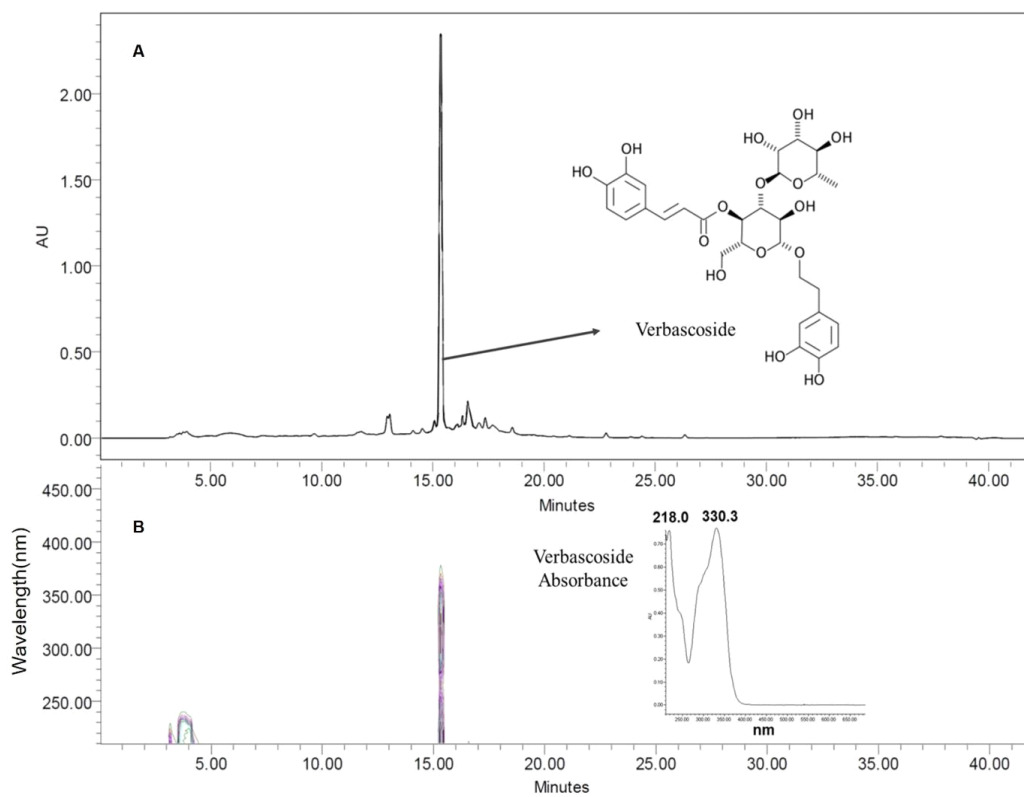
보여주는 것처럼 CTE의 주요 화합물은 verbascoside ( $160.3 \pm 2.4$  mg/g)인 것으로 분석되었다. 반면에 verbascoside 외의 다른 식물화합물들은 비교적 낮은 수준으로 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 따라서 이어지는 동물실험은 항산화 활성과 식물화합물 함량이 가장 높은 잎 추출물을 사용하여 수행하였다.

**Table 2. Total polyphenol contents and anti-oxidant activities of the extracts derived from *Clerodendrum trichotomum* tissues.**

Tissue	Total polyphenol content (mg GA/mg extract)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
		DPPH radical Scavenging activity	ABTS radical Scavenging activity	Superoxide Scavenging activity
Leaf(CTE)	219.2±4.5	33.1±1.7	34.3±10.3	24.8±2.3
Branch	80.5±1.7	106.0±2.0	88.9±21.9	215.4±9.0
Flower	178.7±3.2	45.2±1.0	56.9±19.5	35.0±0.2
Flower Branch	60.1±3.6	157.4±10.1	150.2±29.9	164.2±24.6
BHA	N/A	5.21±0.4	3.6±0.5	>100
Quercetin	N/A	13.7±0.6	4.4±0.5	12.3±1.4
Allopurinol	N/A	>100	>100	8.98±1.18

Each value is the average±S.D(n=3) of triplicate determinations. IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. CTE, 70% ethanol extract of *Clerodendrum trichotomum* leaf ; BHA, butylated hydroxy Anisole; N/A, not assayed.





**Figure. 1. HPLC chromatogram and 2D contour of verbascoside in CTE.** (A) HPLC chromatogram of CTE. (B) HPLC 2D contour of CTE. Verbascoide peak was identified from their retention time and ultraviolet spectra.

## 2. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 체중감소 효과

고과당 식이로 유도되는 대사증후군에 대한 CTE의 영향을 분석하기 위하여 흰쥐를 3개 실험군으로 나누어 16주 동안 동물실험을 수행하였다. HC군은 39.70% 전분과 6.3% 말토덱스트린을 함유한 사료와 음용수를 자유롭게 공급하며 사육하였다. HF군은 60% 과당을 함유한 사료와 음용수를 자유롭게 공급하며 사육하였다. 반면에 CT투여군은 고과당 식이와 더불어 CTE가 함유된 음용수를 자유롭게 제공하며 사육하였다. CT군은 매일 동물의 체중을 측정하여 체중(kg) 당 500 mg을 섭취할 수 있도록 음용수를 제조하여 제공하였다. 실험 시작 및 종료 시점의 실험군 간의 체중을 비교한 결과, 16주 동안 고탄수화물을 식이한 HC군의 체중 증가는  $377.1 \pm 57.0$  g이었다. 그리고 고과당을 식이한 HF군의 증체량은  $380.3 \pm 28.2$  g 이었고, CT군의 증체량은  $325.8 \pm 24.4$  g 이었다. 다당류를 함유한 사료를 식이한 HC군과 고과당을 식이한 HF군 간의 증체량에는 유의적인 차이가 없었다. 그렇지만, 고과당 식이를 하면서 CTE를 음용수로 섭취한 CT군의 증체량은 음용수를 섭취한 HF군의 증체량에 비해 유의하게 감소하였다(Table 3). 따라서 CTE는 고과당 식이에 의한 체중 증가를 감소시키는 효과를 가진다고 사료된다.

실험 군간 총 식이 섭취량을 조사한 결과, HC군  $3,926.0 \pm 43.3$  g/16 weeks, HF군  $4,589.0 \pm 41.2$  g/16 weeks, 그리고 CT군  $4,546.0 \pm 31.6$  g/16 weeks 이었다. HF군이 HC군에 비해 섭취량이 많았지만, CT군과 HF군 간의 섭취량에는 유의한 차이가 없었다. 또한 실험군간의 음용수 섭취량은 HC군  $5,197.3 \pm 27.3$  mL/16 weeks, HF군  $6,597.1 \pm 37.5$  mL/16 weeks, 그리고 CT군  $7,016.3 \pm 73.5$  mL/16 weeks으로 HF군의 음용량은 HC군에 비해 많았지만, CT군과 HF군 간의 유의적인 차이는 없었다(Table 3).

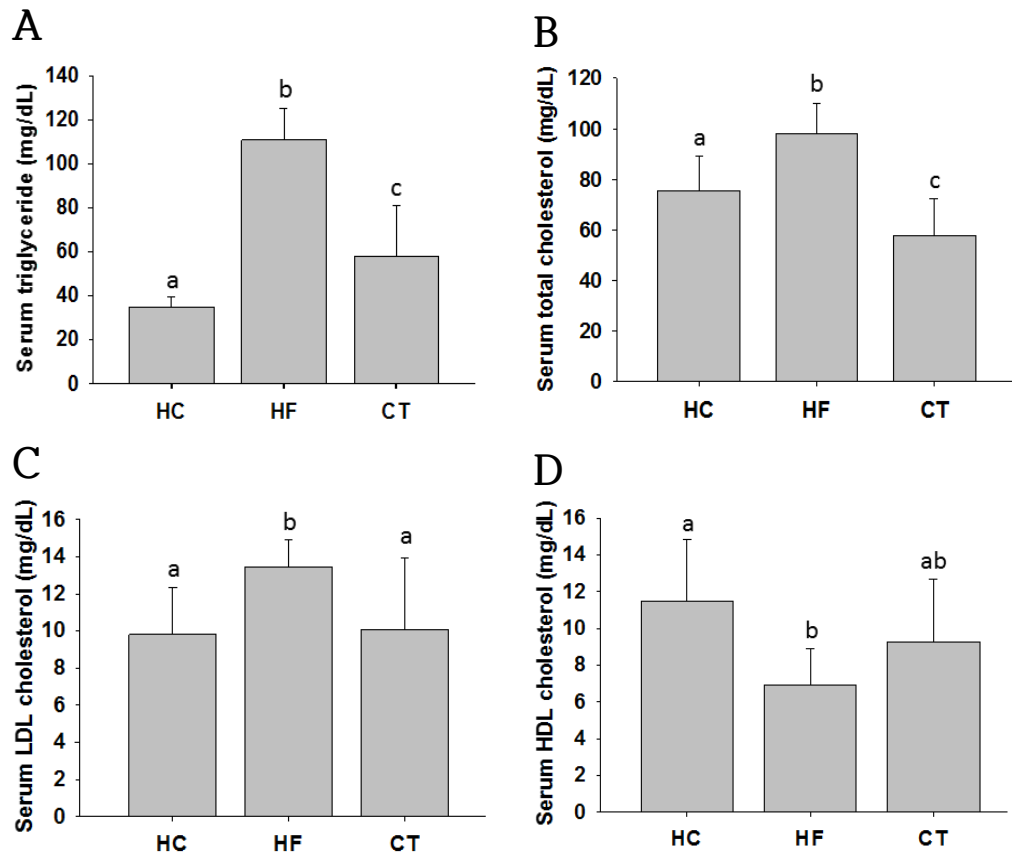
**Table 3. Body weight, food intake, water intake in various experimental groups.**

Group	Body Weight (g)		Weight gain (g)	Total Food intake for 16 weeks (g)	Total Water intake for 16 weeks (mL)
	Initial	Final			
HC	322.5±17.8	699.7±70.0 <sup>a</sup>	377.1±57.0 <sup>a</sup>	3926.0±43.3 <sup>a</sup>	5197.3±27.3 <sup>a</sup>
HF	322.9±22.6	703.1±42.5 <sup>a</sup>	380.3±28.2 <sup>a</sup>	4589.0±41.2 <sup>b</sup>	6597.1±37.5 <sup>b</sup>
CT	310.3±25.9	636.0±42.8 <sup>b</sup>	325.8±24.4 <sup>b</sup>	4546.0±31.6 <sup>b</sup>	7016.3±73.5 <sup>b</sup>

HC (High carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (High Fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water. Data are given as Mean±S.D. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 지질이상혈증 개선 효과

고과당과 고탄수화물을 장기간 식이한 흰쥐에서 혈청 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다(Figure 2). 전분과 텍스트린 등 다당류로 구성된 HC군은 HF군에 비해 혈중 중성지방(Figure 2A), 총 콜레스테롤(Figure 2B), LDL-콜레스테롤(Figure 2C) 농도는 낮게 나타났고, HDL-콜레스테롤(Figure 2C) 농도는 높게 나타났다. 이러한 결과는 흰쥐에서 고과당 식이가 고탄수화물 식이 보다 심각한 지질이상혈증을 유발하고 있음을 말해준다. CTE는 고과당 식이에 의해 유도된 지질이상혈증에 어떠한 영향을 미치는지 분석한 결과(Figure 2), 중성지방 함량은 HF군( $110.9 \pm 14.1$  mg/dL)에 비해 CT군( $57.9 \pm 22.8$  mg/dL), 혈청 총 콜레스테롤 농도는 HF군( $98.00 \pm 12.22$  mg/dL), CT군( $57.83 \pm 14.58$  mg/dL), 혈청 LDL-콜레스테롤 농도는 HF군( $13.46 \pm 1.46$  mg/dL), CT군( $10.07 \pm 3.84$  mg/dL), 그리고 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 HF군( $6.89 \pm 1.99$  mg/dL), CT군( $9.25 \pm 3.41$  mg/dL)으로 CTE는 고과당으로 유도되는 지질이상혈증을 개선하는 작용을 하고 있음을 보여주었다.



**Figure 2. The serum lipid contents in various experimental groups.**

A: serum triglyceride level, B: serum total cholesterol level, C: serum LDL-cholesterol level, D: serum HDL-cholesterol level. Data are given as Mean±S.D (n=4). HC (high carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (high fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water. Data are given as Mean±S.D. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

#### 4. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 혈당 감하 및 인슐린 저항성 개선 효과

##### 1) 혈당강하

장기간 고과당 식이로 유도된 대사증후군 흰쥐모델에서 CTE의 혈당강하 효과를 평가하기 각 실험군 개체들의 혈당을 2주마다 측정하여 Figure 3에 나타내었다. HF군의 혈당 수준은 실험기간 내내 HC군에 비해 높은 수준으로 유지되어 고과당 식이가 고혈당을 유도함을 알 수 있었다. 그러나 CT군과 HF군의 혈당 수준을 비교해보면, 실험 개시 전인 0 주차에 측정한 두 군의 혈당은 각각  $125.71 \pm 8.22$ ,  $122.25 \pm 7.13$  mg/dL으로 비슷하였다. 그러나 16주 동안 혈당 변화를 측정한 결과, 고과당 식이로 유도된 고혈당이 CTE 섭취로 유의하게 감소함을 보여주었다(Figure. 3).

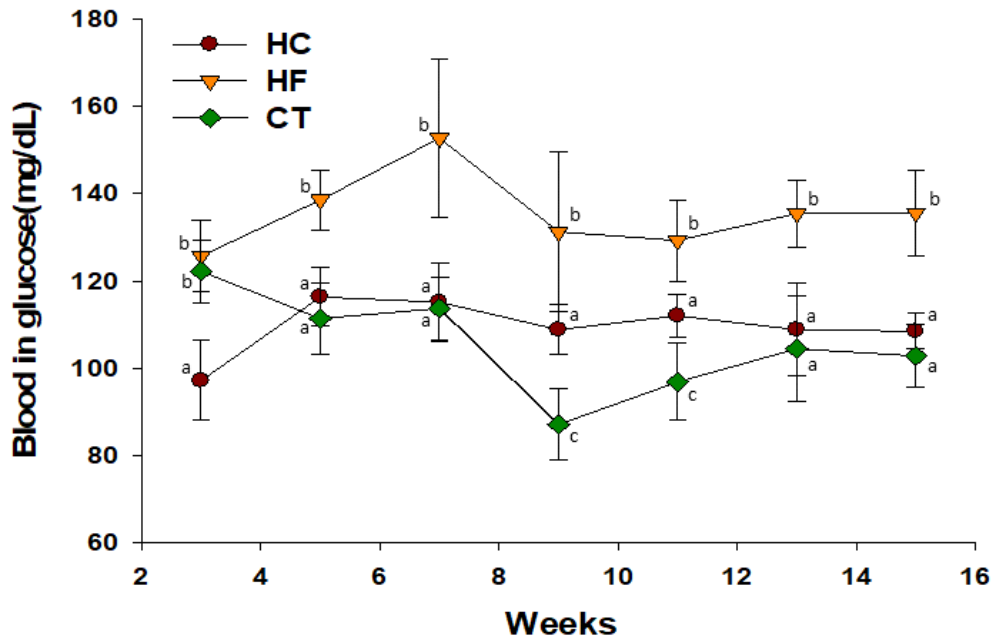


Figure 3. The levels of fasting blood glucose in various experimental groups. Data are given as Mean±S.D. HC (high carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (high fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water. Data are given as Mean±S.D. Different letters indicate significant difference (  $p < 0.05$ ).

## 2) 내당능 개선

16주 동안 실험이 끝난 후 HC군, HF군, CT군의 개체들을 대상으로 경구 내당능검사(oral glucose tolerance test)를 수행하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이 고과당 식이는 고탄수화물 식이에 비해 심각한 인슐린 저항성을 유발함을 보여주었다. 그러나 고과당 식이로 유도된 인슐린 저항성은 CTE 투여로 개선되는 결과를 보여주었다.



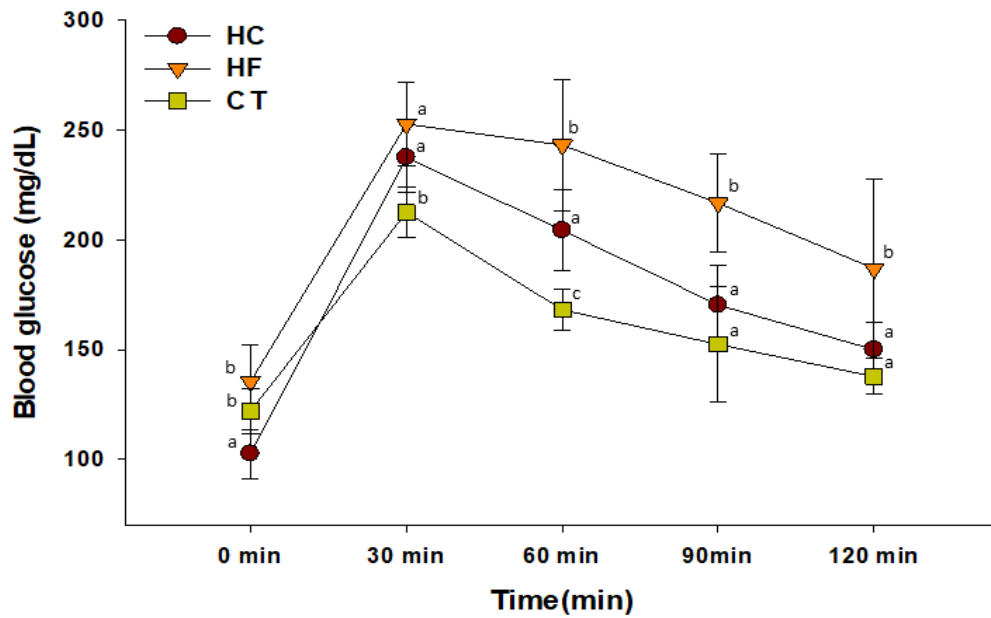


Figure 4. The oral glucose tolerance test in various experimental groups. Data are given as Mean±S.D. HC (high carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (high fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water. Data are given as Mean±S.D. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3) 혈청 인슐린 농도 감소 및 인슐린 저항성 개선

한편, 각 실험 군의 혈청 내 인슐린 농도를 측정된 결과, HF( $1.71 \pm 0.79 \mu\text{g/L}$ )군이 HC( $0.64 \pm 0.25 \mu\text{g/L}$ )군 보다 2배 이상 높았다. 고과당 식이와 더불어 CTE를 투여한 CT군에서는 혈청 인슐린 농도( $0.54 \pm 0.11 \mu\text{g/L}$ )가 가장 낮게 측정되었다(Figure 5A). 인슐린 저항성의 지표인 HOMA-IR은 HC군  $2.75 \pm 1.03$ , HF군  $10.69 \pm 5.15$ , CT군  $3.19 \pm 1.65$ 로 나타나(Figure 5B), CTE는 고과당식으로 유도된 인슐린 저항성을 유의적으로 개선함을 보여주었다.

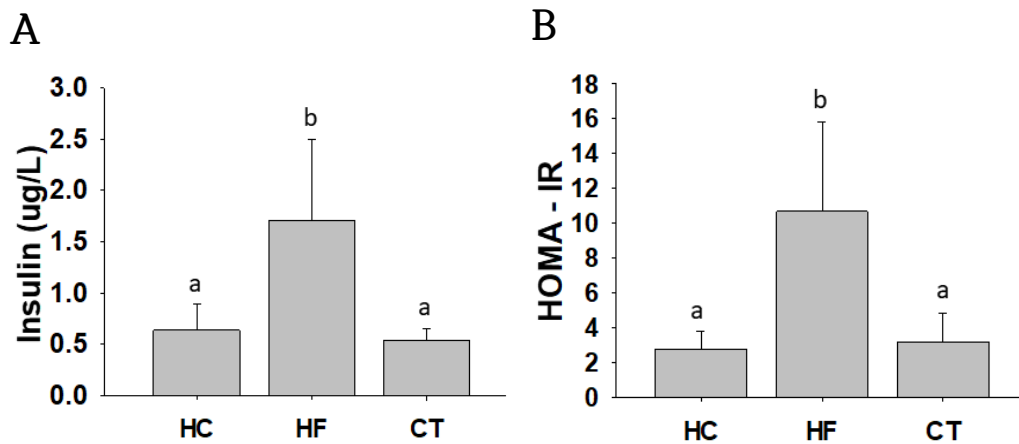


Figure 5. The serum insulin level(A) and HOMA-IR(B) in various experimental groups. Data are given as Mean±S.D. HC (high carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (high fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water. Data are given as Mean±S.D. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

## 5. 고과당 식이 흰쥐에서 CTE의 간 기능 개선 효과

### 1) 혈청 GOT 및 GPT 활성

고과당 식이로 유도된 간 조직의 손상에 미치는 CTE 효과를 분석하기 위하여 각 실험군의 혈청 내 GOT, GPT 활성을 측정하였다(Figure 6). HC군과 HF군 두 그룹 간의 간기능 마커인 GOT 및 GTP 활성에는 차이가 없었다. 이는 고탄수화물 식이와 고과당 식이는 동등한 수준으로 간 기능에 영향을 주고 있음을 알 수 있었다. 그러나 고과당 식이로 유도된 GOT 및 GPT 활성 증가는 CTE에 의해 유의적으로 감소하였다.

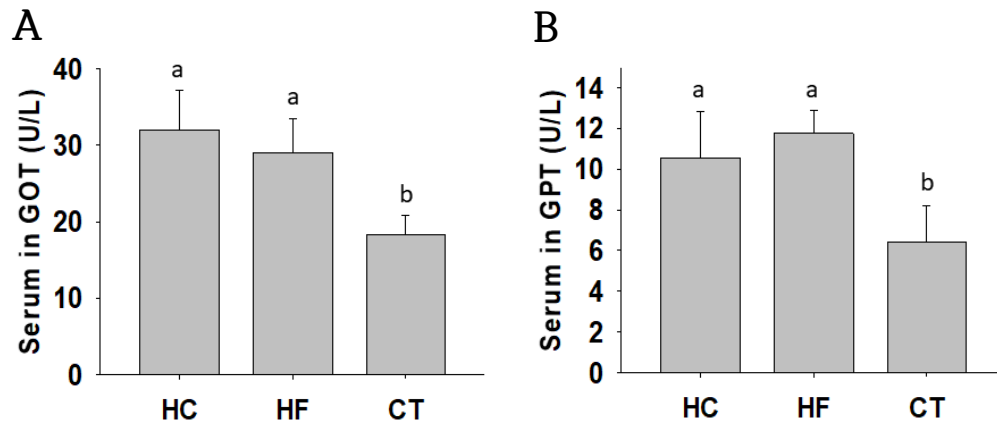
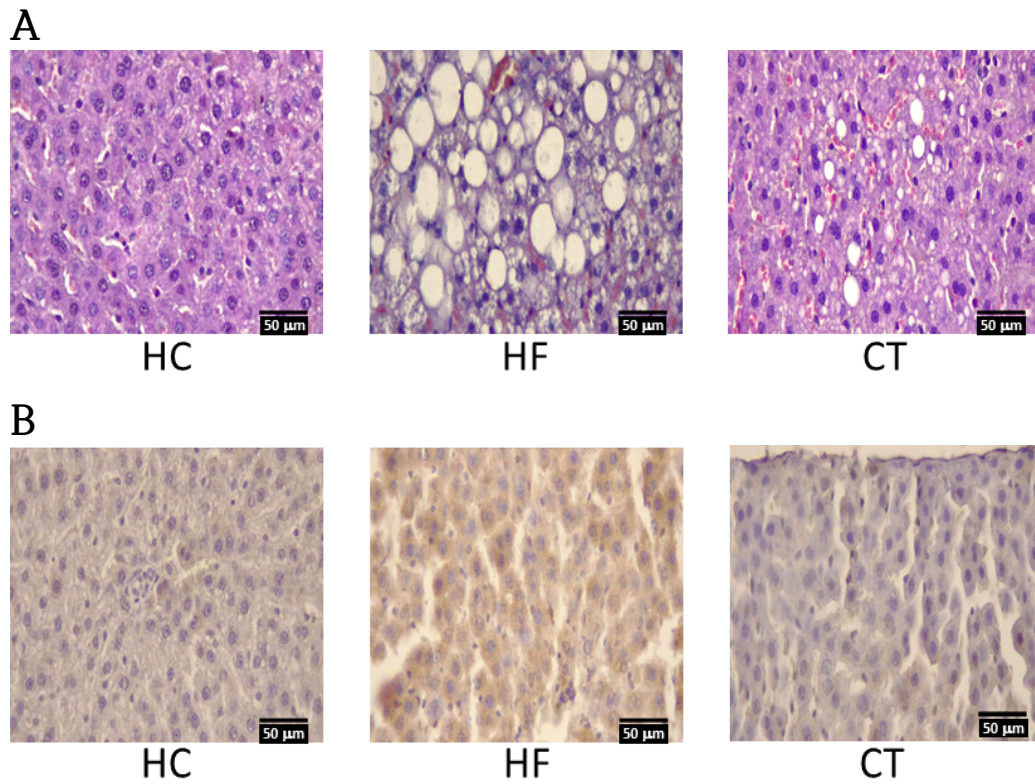


Figure 6. The serum GOT(A) and GPT(B) levels in various experimental groups. Data are given as Mean±S.D. HC (high carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (high fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water. Data are given as Mean±S.D. Different letters indicate significant difference( $p < 0.05$ ).

## 2) 간의 조직학적 변화 관찰

고과당 식이로 유도된 간 기능 상해에 CTE가 미치는 영향을 분석하기 위하여 각 실험군의 간 조직을 관찰하였다. H&E 염색을 통해 확인한 결과, HF군의 간 조직은 HC군의 간 조직에 비해 많은 지방구가 축적되어 지방간이 유도되었음을 보여주었다. 그렇지만 고과당 식이와 더불어 CTE를 투여한 CT군의 간 조직은 지방구 크기와 수가 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다(Figure 7A). IHC염색을 통해 TNF- $\alpha$ 의 발현을 확인한 결과 HF군에서 전체적으로 발현이 나타난 것을 볼 수 있으며, CT군에서 HF군에 비해 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Figure 7B). 또한, 염증 마커인 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 CTE의 영향을 immunohistochemistry (IHC) 염색으로 확인한 결과, CTE는 고과당 식이로 유발되는 간조직의 염증반응을 감소시키는 항염활성을 가지고 있음을 보여주었다.



**Figure 7. Microscopic examinations of liver tissues in various experimental groups.** (A) Hematoxylin and eosin staining of hepatic paraffin sections at  $\times 400$  magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$  (B) Immunohistochemical staining of hepatic paraffin sections at  $\times 400$  magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ , HC (high carbohydrate); 46% carbohydrate diet, HF (high fructose); 60% fructose diet, CT; 60% fructose diet + 500 mg/kg of CTE in drinking water.

## 6. 고과당 식이 흰쥐 간 조직의 단백질 발현에 미치는 CTE의 영향

고과당을 식이한 흰쥐 간 조직의 단백질 발현에 미치는 CTE의 영향을 western blot으로 분석하였다. CTE는 세포내 에너지 감지기로 지방산 산화에 관여하는 AMPK를 활성화 시켰다(Figure 8A). 또한, CTE는 지방산 합성에 관여하는 전사인자인 SREBP-1과 그 표적 유전자인 FAS 발현을 유의적으로 감소시켰다(Figure 8B). 이 결과는 CTE가 간 조직에서 지방산 산화를 촉진함과 동시에 지방산 합성을 억제함으로써 고과당 식이로 유도되는 지방간 생성을 억제하는 작용을 할 것으로 추정된다.



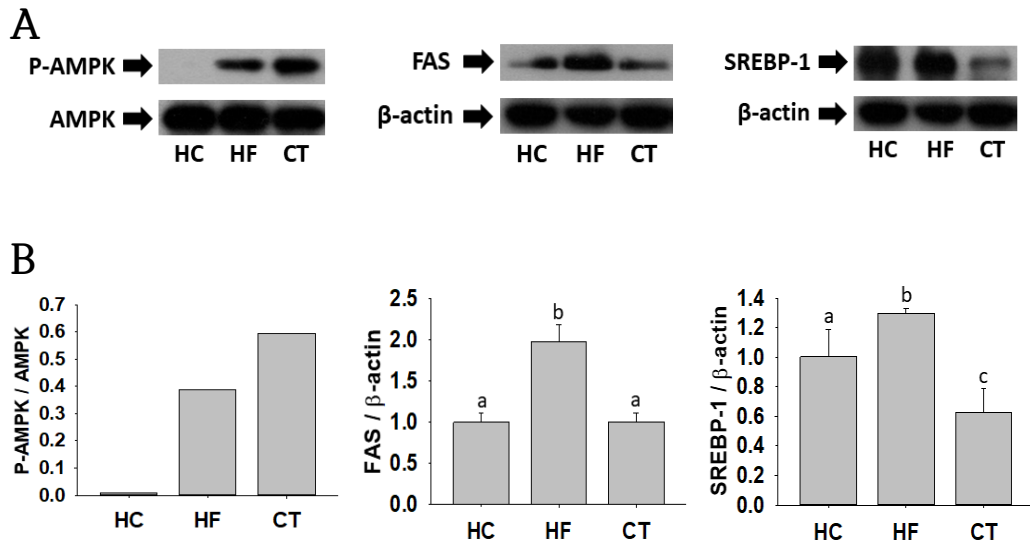


Figure 8. The expressions of AMPK, FAS, SREBP-1 in the liver tissues of various experimental groups. (A) The protein level were determined by western blot analysis. The data shown are representative of three experiments. (B) Relative band intensity was determined by densitometry. The results are expressed as the mean $\pm$ S.D.

## IV. 고찰

누리장나무는 마편초과에 속하는 낙엽관목으로 어린 가지와 잎은 혈압강하, 진정, 진통 및 소염작용 등 다양한 생리활성을 가진다고 알려져 있다(Park 등., 2007). 본 연구에서는 제주도 전 지역에 광범위하게 자생하는 누리장나무의 생리활성을 검증하여 인슐린 저항성과 지질이상혈증 개선소재로서의 활용가능성을 연구하였다. 우선 누리장나무가 왕성하게 성장하는 시기를 선정하여 조직별 추출물을 제조하여 이들의 항산화 활성과 총 폴리페놀 함량을 조사하여 연구 대상 조직을 선발하였다. 그리고 누리장나무 추출물의 효능을 검증하기 위해 장기간 고과당을 식이한 흰쥐 모델을 이용하였다.

누리장나무 잎, 가지, 꽃, 꽃가지 등의 에탄올 추출물들의 항산화 활성(DPPH, ABTS, Superoxide 소거 활성)과 총 폴리페놀 함량을 비교한 결과, 여러 조직 추출물 중에 잎 추출물(CTE)이 가장 높은 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성을 나타내어 동물실험을 위한 시료로 선정되었다. 또한, CTE에 함유된 식물화합물 중에 verbascoside 가 지표물질로 동정되었다. 폴리페놀은 인체의 건강적인 측면에서 이익을 줄 수 있는 중요한 요소로 과일, 야채, 견과류, 곡물 등 다양한 식물에 존재하는데 질병, 알러지, 항암, 심장병 예방 등의 기능을 하며 항산화와 연관되어 있다고 알려져 있다(Bravo 등., 1998; Urquiaga 등., 2000). 폴리페놀의 함량은 항산화 활성과 비례관계에 있으며, 활성산소종(ROS) 소거, NO의 생성 억제, iNOS, COX-2와 같은 전염증성 매개인자의 발현을 조절하는 항염작용을 매개한다(Hussain 등., 2016). NO는 활성산소종의 하나로 정상인 세포내에서는 신호전달기능과 혈압조절기능, 혈소판 응집 등의 반응을 조절하나 병리적인 원인 혹은 LPS 또는 Interlukin-1 (IL-1)의 자극으로 생성되어 염증과 조직, 신경 손상과 만성염증을 유발한다(Coleman 등., 2001; Kang 등., 2014; Nathan 등., 1992; Kim 등., 2015).

과당(fructose)이 우리 몸으로 들어오면 간에서 즉각적으로 대사된다.

해당과정을 거치지 않고 바로 분해되기 때문에 간 내 유리지방산 농도가 증가하게 되며, 이는 포도당신생, VLDL 및 중성지방 합성 등을 증가시켜 인슐린저항성을 일으키며 이상지질혈증, 지방간을 유발한다고 보고되었다(Bray 등., 2004). 장기간 고탄수화물 식이한 실험군(HC)과 고과당을 식이한 실험군(HF)에서 측정된 바이오 마커들은 고탄수화물 식이에 비해 고과당 식이가 대사증후군을 유발하는 요인으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 각 실험군에서 측정된 체중 및 식이섭취량을 비교해 보면, 음용수에 혼합하여 투여한 CTE가 실험동물의 식이섭취량에 영향을 주지는 않았다. 따라서 고과당 식이에 의한 체중 증가가 CTE 투여에 의해 유의적으로 감소하는 결과를 나타내어 CTE를 장기간 섭취 시에 항비만 효과를 가질 것으로 사료된다.

인슐린의 분비가 감소하거나 인슐린 저항성이 증가하면 혈당이 쉽게 떨어지지 않는 내당능장애가 나타난다(Kitabchi 등., 2005). HF군은 HC군에 비해 높은 혈당을 유지하여 고과당 식이가 고탄수화물 식이에 비해 고혈당 유발 효과가 크다고 사료된다. 고과당을 식이하면서 음용수로 CTE를 투여받은 CT군은 HF군에 비하여 유의적으로 혈당 및 내당능이 감소하였다. 또한, 혈청 인슐린 농도와 HOMA-IR을 측정한 결과로부터 CTE의 인슐린 저항성 개선효과를 확인할 수 있었다. HOMA-IR은 인슐린 저항성을 평가하는 방법으로서 과정이 간단하여 임상연구에 적합하며 인슐린 저항성이 높아지면 HOMA-IR이 증가하게 된다. 인슐린 저항성이 증가하게 되면 간에서 당 신생이 증가하면서 공복혈당이 증가하여 나아가 제2형 당뇨병으로 발전하게 된다(Kang 등., 2005; Arner 등., 2002; Xie 등., 2003). HOMA-IR 값은 CTE가 고과당 식이로 유도되는 내당능장애를 예방/개선하는 작용을 보여주는 결과라고 판단된다.

대사증후군에서 일반적으로 보이는 이상지질혈증은 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤의 증가와 HDL-콜레스테롤의 감소 등을 말할 수 있으며 특히 중성지방의 증가와 HDL-콜레스테롤의 감소는 대사증후군을 정의하는 5가지 증후에 해당한다(Reaven 등., 1987; Goldberg 등., 1981; Arner 등., 2002; Kao 등., 1999; Choi 등., 2008). 중성지방과 총 콜레스테롤,

LDL-콜레스테롤의 함량은 HF군이 HC군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 그러나 CTE를 음용한 CT군의 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤의 함량은 HF군에 비해 유의적으로 감소하였고, HDL-콜레스테롤은 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 CTE가 고과당 식이로 유도된 지질이상혈증을 효과적으로 예방/개선하는 작용을 하는 것으로 사료된다. 고농도 과당을 장기간 섭취하면 간 내에서 지질대사의 체계가 무너지며 중성지방의 합성, 축적이 활성화되어 간이 비대해진다. 이 과정에서 간 조직이 손상되면 간세포에 존재하는 효소인 GOT와 GPT가 혈액으로 방출된다(Maiti 등., 2004; Stanely 등., 2000; Anderson 등., 1984; Cha 등., 2005). 실험군 간의 혈청 GOT, GPT 수치를 비교해 보면 CTE는 고과당 식이로 유도되는 간 조직 손상을 예방/개선하는 작용을 시사한다.

CTE의 분자적 작용기전을 추론하기 위하여 간 조직에서 특정 단백질의 발현양상을 분석하였다. AMP-activated protein kinase(AMPK)는 생체 내에서 에너지의 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 담당한다. 활성화된 AMPK는 ATP를 소모하는 지방산 합성을 억제하고 ATP를 합성하는 지방산 산화를 촉진시킨다. CTE는 고과당 식이군에서 억제된 상태에 있는 AMPK를 활성화시켰다. 또한, 간 조직에서 sterol regulatory element-binding protein (SREBP)의 중성지방 및 콜레스테롤의 합성에 핵심적인 역할을 담당하며, SREBP-1은 유리지방산 및 중성지방에 합성에 관여한다고 보고되어있다(Chen 등., 2017; Roden 등., 2006; Zhao 등., 2019). 인슐린 저항성이 생성되면 고혈당, 고인슐린혈증에 의해 SREBP-1과 fatty acid synthase (FAS) 단백질 발현이 증가된다. 이러한 결과로 인해 지방합성 관련 단백질들의 발현이 증가로 지방합성이 증가되어 지방산 산화에 장애가 나타나고 간세포내의 중성지방이 축적된다(Horton 등., 2002; Sakai 등., 1996). 고과당 식이로 대사증후군을 유도한 흰쥐의 간에서 CTE는 SREBP-1과 그 하위 인자인 FAS의 발현을 감소시켰다. 또한, CTE는 간 조직에서 지방구의 감소와 TNF- $\alpha$ 의 발현을 감소시킨다. TNF- $\alpha$ 는 일반적인 상태에서는 발현되지 않지만 염증이 발생하였을 때 혈장이나 조직에서 발현이 증가되는 전염증성 cytokine으로 면역, 염증, 세포자살 과정에 중요한 역할을 하며,

심혈관질환이나 신장질환 등에서 영향을 끼친다고 알려져 있다. 따라서 CTE는 고과당 식이로 인해 유도된 대사증후군 흰쥐 모델에서 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하고 지방구를 감소시킴으로서 지방간 생성 및 항염증 작용을 한다고 사료된다(Koch 등., 1994; Breese 등., 1994; Al-Lamki 등., 2005; Nakagawa 등., 2006). 본 연구 결과는 누리장나무 잎 추출물(CTE)이 항염증 작용과 더불어 고과당 식이로 유도된 이상지질혈증, 인슐린 저항성 및 지방간 생성을 억제하는 대사증후군 개선 소재로서의 활용가능성을 시사해 준다.

## V. 참고 문헌

이윤정, 김혜음, 윤정주, 이소민, 안유미, 고정현, 강대길, 고과당식이  
랫드모델에서 홍삼과 상엽 혼합투여에 의한 대사증후군 개선효과,  
*대한본초학회지*, 27(6) (2012) 99-105.

전홍신, 박병규, 고경숙, 누리장나무 추출물의 세포독성 및 항산화 활성효과  
연구, *한국인체미용예술학회지*, 18 (2017) 183-193.

전홍신, 최정윤, 이인철, 화장품 소재 개발에 관한 누리장나무 (*Clerodendrum  
trichotomum*) 에탄올추출물의 생리활성, *대한미용학회지*, 13(3) (2017)  
209-214.

통계청, 2018년 사망원인 통계 결과(주요 사망원인별 사망률 추이), 2019

통계청, 2018년 한국의 사회지표(출산율과 사망률), 2019

홍성진, 어지현, 은종방, 추출 조건을 달리한 참가시나무, 팥나무, 누리장나무  
잎 열수추출물의 이화학적 특성 및 항산화 활성, *한국식품저장유통학회지*,  
25(7) (2018) 846-854.

Alberti KGMM, Zimmet PZ, Definition, diagnosis and classification of  
diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and  
classification of diabetes mellitus, Provisional report of a WHO  
consultation, *Diabetic medicine*, 15(7) (1998) 539-553.

Anderson JW, Jones AE, Riddell-Mason S, Ten different dietary fibers  
have significantly different effects on serum and liver lipids of

- cholesterol-fed rats, *The Journal of nutrition*, 124(1) (1994) 78-83.
- Arner, P. (2002). Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids, *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18(S2), S5-S9.
- Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, Bradley JR, TNFR1-and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury, *The FASEB Journal*, 19(12) (2005) 1637-1645.
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM, Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity, *The American journal of clinical nutrition*, 79(4) (2004) 537-543.
- Bravo L, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition reviews*, 56(11) (1998) 317-333.
- Breese EJ, Michie CA., Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Macdonald TT, Tumor necrosis factor  $\alpha$ -producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 106(6) (1994) 1455-1466.
- Cersosimo E, DeFronzo RA, Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases, *Diabetes/metabolism research and reviews*, 22(6) (2006) 423-436.
- Cha HS, Seong KS, Kim SH, Seo JW, Park SJ, Kim SI *et al*, Protective effects of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) on drug-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of the Korean Society of Food Science*

*and Nutrition*, 34(9) (2005) 1344-1349.

Choi CS. Pathogenesis of insulin resistance, *The Korean Journal of Medicine*, 77(2) (2009) 171-177.

Choi HT, Kim ES, Ham SS, Park SY, Chung HY, Effects of complex food ingredient composed of garlic and fermented soybean hypocotyl on the serum lipid profiles of the rats fed high-fat diet, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 40(2) (2008) 215-219.

Coleman JW, Nitric oxide in immunity and inflammation, *International Immunopharmacol.* 1(8) (2001) 1397-1406.

Choo HN, Lee SI, Kim JS, Jeong JK, Effect of *Clerodendron trichotomum* Thunberg tea on anti-hypertension, *The Korea Journal of Herbology*, 30(4) (2015) 129-135.

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR *et al*, The metabolic syndrome. *Endocrine reviews*, 29(7) (2008) 777-822.

Dewitt D, Smith WL, Yes, but do they still get headaches?, *Cell*, 83(3) (1995) 345-348.

Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ, The metabolic syndrome, *The lancet*, 375(9710) (2010) 181-183.

Expert Panel on Detection, E, Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on



detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III), *Jama*, 285(19) (2001) 2486-2497

Folin O, Denis WA, A colorimetric method for determination of phenols (phenol derivatives) in urine, *Journal of Biological Chemistry*, 22(2) (1915) 22:305-308

Goldberg RB, Lipid disorders in diabetes, *Diabetes care*, 4(5) (1981) 561-572.

Han KS, Park YH, Kim SN, Lee SJ, Yang SH, Influencing factors on quality of life in patients with metabolic syndrome, *Korean Journal of Stress Research*, 21(4) (2013) 303-311.

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N, Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?, *Oxidative medicine and cellular longevity*, (2016).

Jeong KS, Korea health statistics 2015, Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES VI-3), (2016).

Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR *et al*, Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 46(6) (2014) 729-733.

Kang ES, Yun YS, Park SW, Kim HJ, Ahn CW, Song YD *et al*, Limitation of the validity of the homeostasis model assessment as an

- index of insulin resistance in Korea, *Metabolism*, 54(2) (2005) 206–211.
- Kang MJ, Kim JH, Choi HN, Kim MJ, Han JH, Lee JH, Kim JI, Hypoglycemic effects of Welsh onion in an animal model of diabetes mellitus, *Nutrition research and practice*, 4(6) (2010) 486–491.
- Kao WL, Folsom AR, Nieto FJ, Mo JP, Watson RL, Brancati FL, Serum and dietary magnesium and the risk for type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, *Archives of internal medicine*, 159(18) (1999) 2151–2159.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ, Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms, *Circulation*, 113(15) (2006) 1888–1904.
- Kim JH, Song H, Ko HC, Lee JY, Jang MG, Kim SJ. Anti-oxidant and anti-inflammatory properties of *Clerodendrum trichotomum* leaf extracts, *Journal of Life Science*, 27(6) (2017) 640–645.
- Kim MK, Kim DY, Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage, *Korean Journal of Food Preservation*, 22(5) (2015) 735–743.
- Kitabchi AE, Temprosa M, Knowler WC, Kahn SE, Fowler SE, Haffner SM *et al*, Diabetes Prevention Program Research Group Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin, *Diabetes*, 54(8) (2005) 2404–2414.

- Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL *et al*, Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis, *The Journal of Immunology*, 152(8) (1994) 4149-4156.
- Lim S, Shin H, Song JH., Kwak SH, Kang SM, Yoon JW *et al*, Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey for 1998 - 2007, *Diabetes care*, 34(6) (2011) 1323-1328.
- Maiti R, Jana D, Das UK, Ghosh D. Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of ethnopharmacology*, 92(1) (2004) 85-91.
- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O *et al*. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(3) (2006) F625-F631.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *The FASEB journal*, 6(12) (1992) 3051-3064.
- Oh SY, Kim JW, Lee KL, Hwang BY, Han JW, Lee GY *et al*. Anti-inflammatory activity of the methanol extract of leaves *Clerodendrum trichotomum*, *Bull. Sci. ED*, 30 (2014) 29-37.
- Park MA, Kim HJ, Anti-inflammatory constituents isolated from *Clerodendron trichotomum* Tunberg leaves (CTL) inhibits pro-inflammatory gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7

- macrophages by suppressing NF- $\kappa$ B activation, *Archives of pharmacal research*, 30(6) (2007) 755.
- Reaven GM, Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*, 37(12) (1988) 1595-1607.
- Seong SC, Kim YY, Park SK, Khang YH, Kim HC, Park JH *et al*, Cohort profile: the national health insurance service-national health screening cohort (NHIS-HEALS) in Korea, *BMJ open*, 7(9) (2017).
- Shrivastava N, Patel T, Clerodendrum and healthcare: An overview. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology, (2007).
- Stanely P, Prince M, Menon VP, Hypoglycaemic and other related actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan-induced diabetic rats, *Journal of ethnopharmacology*, 70(1) (2000) 9-15.
- Urquiaga INES, Leighton F, Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, *Biological research*, 33(2) (2000) 55-64.
- Reaven GM, Abnormal lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *The American journal of medicine*, 83(3) (1987) 31-40.
- Xie JT, Wang A, Mehendale S, Wu J, Aung HH, Dey L *et al*. Anti-diabetic effects of *Gymnema yunnanense* extract. *Pharmacological research*, 47(4) (2003) 323-329.

## VI. 요약

대사증후군(Metabolic syndrome)은 내당능 감소, 지질이상혈증, 고혈압, 비만 등과 같은 대사이상 상태가 나타난 것을 말한다. 대사증후군의 원인은 아직 불명확하지만, 인슐린 저항성이 핵심적인 요인으로 판단되고 있고, 인슐린 저항성은 고지혈증, 당뇨병, 심혈관질환, 비만 등과 같은 다양한 질환을 초래시킬 수 있다. 한의학에서 누리장나무(*Clerodendrum trichotomum*)의 잎은 고혈압, 편두통, 말라리아 치료에 사용되어왔다. 그래서 본 연구는 대사질환에 대해 누리장나무 추출물의 효과를 조사한 것이다. 먼저, 누리장나무 잎 추출물(CTE)의 총 폴리페놀 함량이  $219.47 \pm 4.50 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 측정되었고, 항산화 효능을 확인한 결과 DPPH 소거효능( $\text{IC}_{50}$ ;  $33.06 \pm 1.65 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), ABTS 소거효능( $\text{IC}_{50}$ ;  $34.28 \pm 10.26 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 superoxide 소거효능( $\text{IC}_{50}$ ;  $23.77 \pm 2.29 \mu\text{g}/\text{mL}$ )이 나타났다. 다음은 고과당 식이를 섭취한 동물모델에서 CTE의 효과를 검증하였다. 실험동물은 수컷 SD계 흰쥐를 세 그룹(고탄수화물군, 고과당군, 누리장나무군)으로 나누어 실험에 사용하였으며, 고탄수화물군(High carbohydrate, HC)은 46% 탄수화물 함유 식이, 고과당군(High fructose, HF)은 60% 고과당 함유 식이, 누리장나무군(CT)은 60% 고과당 함유 식이에 누리장나무 잎 에탄올 추출물을 음용수(CTE 500 mg/kg/day in water)에 섞어 16주 동안 섭취하게 하였다. 실험을 진행한 후 혈당과 인슐린 수치는 HF군과 비교했을 때 CT군에서 현저하게 감소되어 나타났고, 인슐린 저항성은 개선되었다. 또한, CT군에서 혈중 triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol은 감소되었고, High-density lipoprotein cholesterol은 증가한 것으로 나타났다. 간조직에서 Hematoxylin & Eosin 및 TNF- $\alpha$  표적 Immunohistochemistry 방법을 활용한 조직학적 분석을 수행한 결과 CTE가 지방 축적과 염증반응을 현저하게 감소시킨 것으로 나타났다. 더욱이, CTE는 간조직에서 sterol regulatory element binding protein 1 및 fatty acid synthetase 단백질이 감소시켰으며, 지방산 산화와 관련한 AMP-activated protein kinase 단백질의 인산화를 증가시켰다. 종합해보면, 이러한 결과들은 CTE가 고과당 식이로 유도

된 쥐에서 지방간과, 고지혈증 및 인슐린 저항성을 개선시킨다는 것을 제시하고 있다. 따라서 누리장나무 잎 추출이 대사이상 예방을 위한 유용한 천연 소재가 될 수 있을 것으로 사료된다.