

당뇨유발쥐에서 닭의장풀의 혈당감소효과와 간조직내의 Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase의 효소활성에 미치는 효과

박 수 영 · 조 경 혜*
서울여자대학교 자연과학대학 생물학과

Effects of *Commelina communis* L. on the Blood Glucose Level in Alloxan Induced Diabetic Rat and the Biochemical Properties of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from the Rat Livers

Soo Young Park and Kyung Hea Cho*
Department of Biology, College of Natural Science,
Seoul Woman's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract—The hypoglycemic and metabolic effects of *Commelina communis* L. extract were investigated in alloxan induced diabetic rats. The increased blood glucose level in the diabetic rats was significantly reduced and the loss of body weight was recovered with the treatment of the plant protein fractions(30~70% ammonium sulfate precipitates). Administration of the plant protein fractions elicited the significant increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) activity and liver weight which were decreased in the diabetic rat liver. G-6-P DH was partially purified from extract- or insulin-treated diabetics, diabetic control, and normal rat liver and studied for the biochemical properties.

The K_m value(9.002 mM) of diabetic rat liver enzyme was greatly higher than that (0.033 mM) of normal enzyme indicating the affinity of enzyme for the substrate was significantly reduced in the diabetic rat liver. This reduced affinity of enzyme for the substrate in the diabetic rat was recovered in the extract- or insulin-treated rat liver enzyme having 0.164 or 0.208 mM of their K_m values, respectively.

Although there was no significant difference in the optimum pH(6.0) and optimum temperature(37°C) of enzyme among the experimental groups, the dependence of their activities on pH appeared to be slightly resistant in the extract- or insulin-treated group compared to the diabetic group. In order to investigate the antigenicity of rat liver enzyme among experimental groups, enzyme-linked immunosorbent assay was carried out by using anti-G-6-P DH anti-serum. Absorbance(0.102) shown in the normal rat liver was reduced even below zero in the alloxan-diabetic rat liver, but increased again in the extract- or insulin-treated rat liver(0.096 or 0.118, respectively).

The result of this study suggested that G-6-P DH may be used as a marker enzyme

* To whom correspondence should be addressed

to diagnose and to indicate the progress of the diabetics, and the hypoglycemic effect of the extracts of *Ccmmelina ccmunis* L. was certainly associated with action or mode of C-6-P DH on the rat liver.

Keywords—*Ccmmelina ccmunis* L. • alloxan-diabetic rat • hypoglycemic effect • glucose-6-phosphate dehydrogenase

현대문명의 발달과 더불어 각종 성인병의 발생과 증가에 따라 치료제 개발 필요성과 약물복용에 따른 독성문제 및 환자의 약물에 대한 내성문제가 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 따라서 최근에는 이들 약용식물로 부터 약리활성 물질을 분리하여 화학약물로부터 야기되는 여러 문제점들을 보완하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 미흡하나마 분석된 약용식물의 약리유효성분은 대개가 alkaloid나 steroid 계열의 작은 유기화합물들로 알려져 있으며 연구되어 왔다¹⁻⁵⁾. 그러나 이러한 alkaloid나 steroid 계열의 약리성분들은 그 약리효과를 나타낼과 동시에 독성효과 및 부작용을 가져오고 때로는 홀몬분비의 불균형을 초래하기도 한다. 따라서 최근 서구 여러 연구에서 많은 약리유효성분들이 peptide성일 가능성에 초점을 두고 연구가 시도되어 약리 효능을 입증한 바 있다⁶⁻⁸⁾.

비 alkaloid나 비 steroid 계열의 항당뇨성 물질분리에 대한 최근 연구도 매우 활발하여 *Oryza sativa* bran에서 분리한 glycan이나⁹⁾ *Poterium ancistroides*로 부터 얻은 tormentic acid도 항당뇨효과를 가진다고 보고된 바¹⁰⁾ 있다. 또한 glossy *Ganoderma*의 water extract가 glucose를 투입한 쥐의 plasma glucose level의 증가를 억제시킨다고 보고하였고¹¹⁾, 뒤이어 glycan중의 ganoderan B에서의 혈당강하 효과와 그 mechanism에 관한 연구도 보고 된 바 있다¹²⁾.

치료의 대부분은 약물치료, 자연요법 및 식이요법에 의존하고 있고 근래에까지도 민간요법으로 사용되어온 것으로 알려져 있다. 그러나 약용식물은 우리나라에서 수 천년에 걸쳐 질병 치료제로 사용되어 왔으나 약리 유효성분의 분석은 거의 이루어지지 못한 상태로 단순히 구전으로 내려오는 민간요법에 의존하고 있는 형편이다.

닭의장풀 또한 고혈압, 당뇨병, 인후통 및 기

타 여러 질병치료에 좋다는 구전은 있었으나¹³⁾, 실제 실험으로 규명된바 없고 닭의장풀 성분연구만이 일부 진행되어 왔다¹⁴⁻¹⁶⁾. 닭의장풀이 당뇨에 미치는 효과기전을 연구하기 위하여 최근 당뇨병과 관련하여 변화를 보이는 몇 개 효소활성에 관한 보고를 살펴보면 당단백대사에 관여하는 몇가지의 lysosomal glycosidase 효소활성이 당뇨병 쥐의 신장에서 현저히 감소한다고 보고되고 있다¹⁷⁾. 또한 당뇨 환자의 insulin에 대한 내성은 insulin 결합수용체의 부족 및 결합이 그 주요 원인이며¹⁸⁾ 이는 당대사에 관여하는 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase, fatty acid synthetase 및 acetyl coA carboxylase 등의 활성저하가 그 요인의 하나라고 알려져 왔다¹⁹⁾. 이러한 효소활성의 변화가 어떻게 당뇨병을 유발하는지 등의 자세한 작용기전은 밝혀져 있지 않으나 이들에 의해 직접적이든 혹은, 간접적인 과정을 거쳐서든 당뇨에서 보이는 당대사의 감소와 무관하지 않으리라 생각된다.

본 연구에서는 닭의장풀로부터 추출한 peptide 성분이 alloxan으로 당뇨가 유발된 쥐에게서 항당뇨성 약리효능을 나타내는지를 혈당치 감소 여부로써 알아보고 이 성분이 당뇨쥐의 대사과정에 어떠한 변화를 유발하는지를 알아보기 위하여 대조군과 함께 닭의장풀 추출액 및 insulin 처리쥐군의 간 추출액으로 부터 당뇨와 관련된 몇몇 효소의 활성을 측정하고 이중 유의성 있는 표지효소를 분리 정제하여 닭의장풀 추출액의 혈당강하 효과와 이들 대사관련 효소활성과의 상호연관성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

A. 닭의장풀 추출액 및 황화암모늄 침전분획의 조제

본 연구에 사용된 닭의장풀은 1990년도 10월

6일 경기도 마석군 외방리에 있는 축령산에서 채집하여 사용전까지 -80° 냉동고에서 보관하였다.

냉동된 닭의장풀을 예리한 칼로 미세하게 자른 후 유발에 담아 액체질소를 가하여 분말이 되도록 마쇄하였다. 분말을 모아 10 mM Tris·HCl 완충용액, pH 7.4에 용해시킨 후 하루밤 재워 세포내 성분을 용출시키고 4°C 에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 닭의장풀 추출액에 황화암모늄을 입자가 가라앉지 않을 정도로 천천히 소량씩 가하여 그 농도가 30%가 되게 한 후 4°C 의 cold chamber에 넣어 하루밤을 방치하였다. 24시간후 이 용액을 초원심 분리기로 15,000 rpm에서 30분간 4°C 에서 원침하여 침전물과 상등액을 나누어 얻었다. 상등액에는 다시 황화암모늄을 가하여 그 농도가 70%가 되도록 위와 같은 방법으로 시행하였다. 70% 황화암모늄으로 포화된 상등액은 24시간 방치한 후 4°C 초원심분리기로 15,000 rpm에서 30분간 원침하여 침전물을 분리 수거하고 상등액을 버렸다. 이렇게 하여 0~30% 황화암모늄 침전물과 30~70% 황화암모늄 침전물을 얻어 가능한한 소량의 10 mM Tris·HCl 완충용액, pH 7.4를 가하여 완전히 용해한 후 투석막에 넣어 증류수로 투석하여 염용액을 제거하였다. 투석된 용액을 동결건조시키고 필요에 따라 적당한 완충액이나 saline, 또는 증류수로 용해하여 전기영동이나, 동물실험, 그리고 단백질 정량 등에 사용하였다.

B. 동물실험

1. 쥐의 구입 및 사육

동물실험에 사용한 희쥐는 서울대학교 의과대학 동물실로부터 Sprague-Dawley를 구입하였으며 몸무게가 250 g으로 균일하게 자라도록 하였다. 사료는 고형사료를 주었으며 사육실의 온도는 25°C 를 유지하였다.

2. Alloxan에 의한 쥐의 당뇨유발

몸무게 250 g 정도로 키운 쥐의 몸무게를 각기 전 후에 몸무게 1 kg당 40 mg의 alloxan을 함유한 saline 용액 0.5 ml을 미정맥 주사하여 당뇨를 유발시켰고 48시간 후에 꼬리를 잘라 혈액을 채취하여 시험관에 넣고 관 벽을 잘 긁어 혈

병과 혈청이 잘 분리되게 하여 상온에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리로 혈청을 분리하여 당함량을 측정된 후 당뇨 유발을 확인하였다²⁰⁾.

3. 부분정제된 닭의장풀의 황화암모늄 침전분획의 주입

혈당치를 측정된 후 당뇨가 유발된 쥐를 몇개 군으로 나누어서 0~30%, 30~70% 황화암모늄 침전분획 및 인슐린을 투여하였다. 닭의장풀 추출액으로부터 부분정제한 황화암모늄 침전분획 처리군은 제 3군과 제 4군으로 하였고 쥐 몸무게 1 kg당 15 mg의 단백질량을 갖는 추출액을 0.5 ml씩 1일 2회 3일간 경구투여하였고 정상위 대조군(제 1군)과 당뇨유발 대조군(제 2군)은 saline으로 경구투여하였고 인슐린 투여군(제 5군)은 몸무게 1 kg당 40 I.U. (International Unit)으로 1일 2회 3일간 경구투여 하였다. 자료의 통계처리는 Student t-test를 시행하여 효과의 유의성을 검정하였다.

4. 혈당 측정

3일간의 시료 추출액 및 인슐린의 경구투여 후 쥐의 경추부위를 절단하여 일시에 해부하고 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 혈청만 채취하였다. 혈청내의 glucose양은 혈당측정 kit(영동제약, 서울)을 이용하여 측정하였다²¹⁾. 혈중의 glucose 함량의 계산은 다음과 같다.

Glucose(mg/100 ml)

$$= 200 \times \frac{\text{sample의 흡광도}}{\text{glucose 표준액의 흡광도}}$$

5. Glucose-6-phosphate dehydrogenase

활성 측정

당뇨의 대사이상 기전의 연구에 유용하게 사용될 수 있는 당뇨관련 표지로서 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P DH)의 활성을 다음과 같이 측정하였다²²⁾. 5 mM glycylglycine buffer, pH 7.5에 4 mM의 glucose-6-phosphate (G-6-P)와 75 μM 의 NADP⁺와 10 mM의 MgCl₂를 가하고 37°C 에서 30분간 미리 평형화시킨 후 효소용액을 가해 섞은 후 15초 간격으로 340 nm의 파장에서 흡광도를 3분간 측정하였다. 1분 동안 0.01 O.D.₃₄₀의 증가를 보일때의 효소활성

을 1 unit으로 정하였다. 비활성은 시료의 단백질량(mg)으로 나눈 값이다. 단백질량 측정은 Lowry 방법을 변형하여 만든 bicinchoninic acid (BCA) reagent를 이용하여 bovine serum albumin (BSA)을 표준곡선으로 하여 측정하였다²³⁾.

6. Lactate dehydrogenase 활성 측정

G-6-P DH의 분리를 위하여 Hydroxyapatite column을 시행하여²⁴⁾ 각 fraction마다 lactate dehydrogenase 효소활성을 측정하였다²⁵⁾. 3.6 ml의 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.0), 0.2 ml의 0.02 M NAD⁺, 0.2 ml의 0.5 M sodium lactate로 구성된 용액을 37°C로 평형화 시킨 후 효소용액 0.1 ml을 가해 섞은 후 15초 간격으로 340 nm의 파장에서 흡광도를 3분간 측정하였다.

C. G-6-P DH의 생화학적 특성 연구

1. Kinetics

혈당강하 효과와 당대사에 관련하는 G-6-P DH 효소활성과의 관련성을 연구하기 위하여 각 실험군의 간조적으로 부터 G-6-P DH를 부분정제하여 효소의 기질에 대한 친화력을 측정하였다. 사용된 시약은 0.2 ml의 50 mM citrate buffer (pH 6.0)에다 0.1 ml의 효소시료액과 0.1 ml의 1 mM NADP⁺와 0.2 ml의 10 mM MgCl₂를 잘 섞어 37°C로 평형화시킨 다음 0.2 mM에서 20 mM까지의 기질용액(G-6-P)을 각각 0.4 ml씩 넣어 G-6-P DH 효소 활성도를 측정하였다. K_m 값과 V_{max} 값은 위 반응에서 얻은 기질농도에 효소활성도를 Lineweaver-Burk 방정식을 사용하였으며 linear regression을 시행하여 산출하였다.

2. Optimum pH

G-6-P DH의 효소활성에 미치는 pH 영향을 조사하기 위하여 여러 pH 범위를 가진 완충용액을 다음과 같이 준비하였다. pH 3.0과 6.0 범위에서는 50 mM citrate 완충용액을 사용하였으며 pH 6.0과 8.0 범위에서는 100 mM phosphate 완충용액으로, pH 8.0과 9.0 범위는 50 mM barbital 완충용액, 그리고 pH 9.0과 11.0 범위에서는 50 mM carbonate 완충용액을 사용하였다.

각 pH 범위를 가진 완충용액 0.25 ml에다 반응 기질용액(0.1 ml의 1 mM NADP⁺와 0.4 ml

의 2 mM G-6-P, 0.2 ml의 10 mM MgCl₂)을 가하여 섞고 37°C로 평형화 시킨 다음 각 실험군의 간조적 추출액 및 정제분획을 가하여 효소활성을 측정하였다.

3. Optimum temperature

효소의 최적온도 및 열에 대한 내성을 조사하기 위하여 kinetics와 최적 pH에서 얻은 결과중 최대 활성을 나타낼 수 있는 반응조건을 택하여 반응온도를 변화시켜 효소활성을 측정하였다. 반응용액은 0.2 ml의 50 mM citrate buffer (pH 6.0)에 0.1 ml의 1 mM NADP⁺, 0.4 ml의 2 mM G-6-P와 0.2 ml의 10 mM MgCl₂를 잘 섞어 반응온도를 24°C, 30°C, 37°C, 42°C, 50°C와 60°C로 각각 평형화 시킨 후 각 실험군의 간조적 추출액 및 정제분획을 가하여 G-6-P DH 효소활성도를 측정하였다.

D. G-6-P DH의 부분정제 및 단백질형태 연구

1. G-6-P DH의 부분정제

동물실험에 사용된 정상쥐 대조군 및 당뇨병 발 대조군, 그리고 닭의장플로부터 얻은 황화암모늄 침전분획(0~30% 및 30~70%)과 인슐린 투여군으로부터 적출한 간조적을 완충용액 10 mM Tris·HCl를 가해 ice bath (4°C)상에서 마쇄한 후 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 간조적 추출액에 황화암모늄을 가해 80% 포화용액으로 만든 뒤 24 시간 동안 4°C의 cold chamber에서 방치한 후 원심분리하여 황화암모늄 침전물을 얻었다. 이 침전물을 소량의 10 mM Tris·HCl 완충용액에 완전히 용해시킨 후 증류수로 24시간 동안 투석하여 그 상등액을 동결건조하여 G-6-P DH를 얻기 위하여 affinity chromatography를 실시하였다²⁴⁾. Bio-Rad로부터 구입한 Cibacron Blue-4B Sepharose (Affi-Gel)을 column (1.0×10.0 cm, Pharmacia)에 packing 하고 50 mM-phosphate buffer, pH 6.0 완충용액으로 평형화시켰다. 시료를 주입한 후 같은 완충용액으로 gel bed volume의 4배로 씻어준 후 0~1 M KCl 용액을 linear gradient로 가한 완충용액으로 용출시켰다. 용출은 0.5 ml/min의 속도로 하였고 1 ml씩 분획하여 각 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 G-6-P DH 효소활성을 측정하였다. G-6-P

DH 효소활성을 나타내는 분획을 모아 투석한 후 동결 건조시켜 실험에 사용 전까지 -20°C 에서 냉동 보관 하였다. Cibacron Blue 4B Sepharose chromatography를 실시하여 얻은 bound 분획에서 G-6-P DH를 더욱 분리 정제하기 위하여 Bio-Rad로 부터 구입한 Hydroxyapatite (HA) column chromatography를 시행하였다²⁶⁾. Hydroxyapatite gel을 column(1.0×10.0 cm, Pharmacia)에 packing하고 1 mM phosphate buffer, pH 6.0 완충용액으로 평화화시켰다. 시료를 주입한 후 같은 완충용액으로 gel bed volume의 3배로 씻어 준후 0~150 mM의 phosphate linear gradient buffer(pH 6.8) 50 ml을 가해 용출시켰다. 용출은 0.01 ml/min의 속도로 tube당 2 ml씩 분획하였고 280 nm에서 흡광도를 측정한 후 G-6-P DH 및 LDH 효소활성을 측정하였다. LDH 효소활성을 가지는 분획을 제외한 G-6-P DH 효소활성만을 띤 분획을 모아 투석한 후 동결 건조하여 사용전까지 냉동보관하였다.

2. ELISA assay

각 실험군의 간조직에서 부분정제한 G-6-P DH의 항원성을 결정하기 위하여 ELISA를 시행하였다. 96-Well ELISA microplate의 각 well에 부분 정제한 G-6-P DH 시료용액(0.1 mg/ml)에서 100 μl 씩을 취해 coating한 후 2시간 동안 상온에서 incubating시킨 후 PBS-0.05% Tween 용액으로 3회 세척하고 non-specific binding을 방지하기 위해 BSA로 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 PBS-Tween 용액으로 3회 세척한 후 Anti-G-6-P DH(1 : 1,000로 희석)를 첨가하여 incubating 한 후 PBS-Tween로 세척하여 2nd antibody인 alkaline phosphatase가 결합된 항 IgG 용액(1 : 500으로 희석)을 가하여 반응시킨 후 PBS-Tween 20 용액으로 반응되지 않은 2nd antibody를 제거하고 100 μl 의 1% *p*-nitrophenyl phosphate을 가하여 30분 동안 반응시킨 후 5 M NaOH 20 μl 를 가하여 반응을 중지시켰다. 발색 반응용액은 405 nm 파장에서 그 흡광도를 측정하여 항원 항체반응에 의한 반응도를 측정하였다.

결과 및 고찰

A. 닭의장풀 추출액의 혈당강화 효과 및 효소활성 연구

1. 실험군의 체중변화

닭의장풀의 약리효능을 검색하기 위해 동물실험을 실시하였다. Table I에서 보는 바와 같이 40 mg alloxan/kg 체중을 쥐에게 주사하여 당뇨 유발 여부를 확인하였으며 쥐의 몸무게 변화를 살펴 보았다. 정상쥐군에서는 이 기간동안 평균 14 g의 몸무게 증가를 보이는 반면 당뇨 유발군에서는 이 기간동안 정상군의 평균치인 265.0 ± 9.5 에 비해서 239.8 ± 3.6 으로 감소되었으며 5%의 유의수준으로 걸정했을 때 의미를 갖는다고 볼 수 있었다. 이러한 체중감소는 닭의장풀로부터 얻은 황화암모늄 침전분획(0~30% 및 30~70%)을 투여할 경우 농도에 따라 평균 10 및 11 g이 증가되어 각기 257.8 ± 5.7 과 250.0 ± 2.9 로 정상군에 가깝게 회복되었으며 인슐린 투여군도 평균 13 g이 증가되어 260.8 ± 7.2 로 정상군과 거의 같은 값을 나타내고 있다. 따라서 alloxan 투여에 따른 췌장내 β -cell의 파괴로 인한 인슐린 생성의 부족은 당대사에 의한 에너지 생산의 부족을 초래하고 이로 인한 당뇨유발 및 체중감소를 가져오지만 닭의장풀 추출액이나 인슐린에 의해서 회복됨을 알 수 있었다.

2. 닭의장풀 추출액의 황화암모늄 침전분획의 혈당강화 효과

혈당강화 효과를 보인 닭의장풀 침전분획으로부터 혈당강화 효과를 보이는 성분의 분리를 위하여 황화암모늄을 가해 0~30%와 30~70%의 농도에서 침전된 분획을 모아 투석한후 두 성분의 혈당강화 효과를 측정하였다.

Table I에서 보는 바와 같이 alloxan 처리로 당뇨가 유발된 쥐군에서는 높은 혈당치와 함께 심한 체중감소(-54.4)를 보이고 있으며 이를 닭의장풀 추출액 중 0~30% 황화암모늄을 침전분획으로 처리했을 경우 약간의 혈당감소를 보이고 반면에 30~70% 황화암모늄 침전분획을 처리한 경우나 인슐린을 처리한 군에서는 각기 186.51과 230.17 mg/dl의 혈당치를 나타냈으며

Table I. Effect of partially purified *Commelina communis* L. on the body weight and blood glucose levels in alloxan-diabetic rats

Experiment	Dose	No. of animals	Body weight (g)	Blood serum glucose levels(mg/dl)
Normal ^{a)}	2 ml/kg ^{b)}	5	291.00±15.97	158.11± 3.89
Alloxan diabetic control	2 ml/kg ^{b)}	5	236.60±18.09	518.11±97.94
0~30% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitates treated	60 mg/kg (p.o)	5	248.80±11.08	367.56±49.93
30~70% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitates treated	60 mg/kg (p.o)	5	252.60±15.82	186.51±57.94*
Insulin treated	40 I.U./kg (p.o)	5	260.20±11.88	230.17±53.91*

All values are means±S.E. Comparisons were by Student's t-test.

^{a)} : Alloxan untreated group

^{b)} : Saline treated (p.o.)

* : Statistical significance compared with alloxan-diabetic control data : *p<0.05

당뇨 대조군(518.11 mg/dl)에 비해서 각기 10%의 유의수준과 5%의 유의수준으로 검정했을 때 혈당이 감소되었다고 볼 수 있었다. 이러한 혈당강하 효과가 그 단백질 성분에 기인하고 있음은 많은 약리활성 물질이 야기하는 부작용을 억제할 수 있다는 데에 큰 의의가 있다고 하겠다.

B. G-6-P DH의 생화학적 특성 연구

1. Kinetics

각 실험군에서 얻은 간조직 추출액에서 부분 정제한 G-6-P DH의 kinetics를 실시하였다(Fig. 1). 정상쥐 간조직내 효소의 K_m값은 0.033으로써 기질에 대한 높은 친화도를 나타내었다. 그러나 당뇨 유발군내 효소의 kinetics에서는 최대 활성도는 23.2로써 정상군의 값(V_{max}=15.9) 보다 높았지만 기질에 대한 친화도를 나타내는 K_m값은 9.002으로써 정상군 간조직내 효소의 K_m값인 0.033에 비해 매우 낮은 친화도를 갖었다. 이러한 기질농도 증가에 대한 효소활성의 증가는 정상쥐군내 효소의 경우 기질 농도가 2 mM 내지 4 mM일 때 이미 최대치를 나타내었으며 8 mM에서도 대체로 최대값을 그대로 유지하는 포화현상을 보이지만 당뇨 유발군내 효소에서는 기질농도의 증가에 따라 계속적으로 활성도가 증가되는 현상을 보였다. 닭의장풀 추출액의 황화암모늄 침전분획을 처리한 제 3군과 4군의 경우와 인슐린 처리군내 효소활성의 kinetics에서 볼 수 있는 것처럼 효소활성은 매우 낮은

K_m값(각기 0.104, 0.064, 및 0.208 mM)을 가지며 최대활성도를 갖는 농도 또한 1.8, 2.0 및 1.0 mM로써 매우 낮은 농도의 기질과 활발히 반응하여 활성을 나타내었다. 따라서 이들 닭의장풀 추출분획이나 인슐린을 투여한 경우

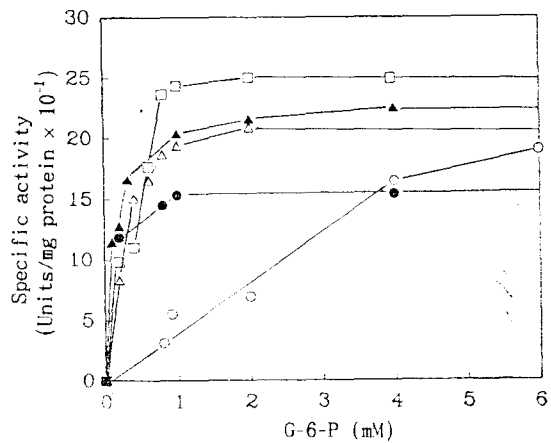


Fig. 1. The effect of *Commelina communis* L. on the kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P DH) activities of rat liver extracts in the alloxan induced diabetic rats (●: The normal rat liver protein fraction, ○: The alloxan-diabetic rat liver protein fraction, △: The 0~30% (NH₄)₂SO₄ precipitated fraction-treated rat liver protein fraction, ▲: The 30~70% (NH₄)₂SO₄ precipitated fraction-treated rat liver protein fraction, □: The insulin-treated rat liver protein fraction).

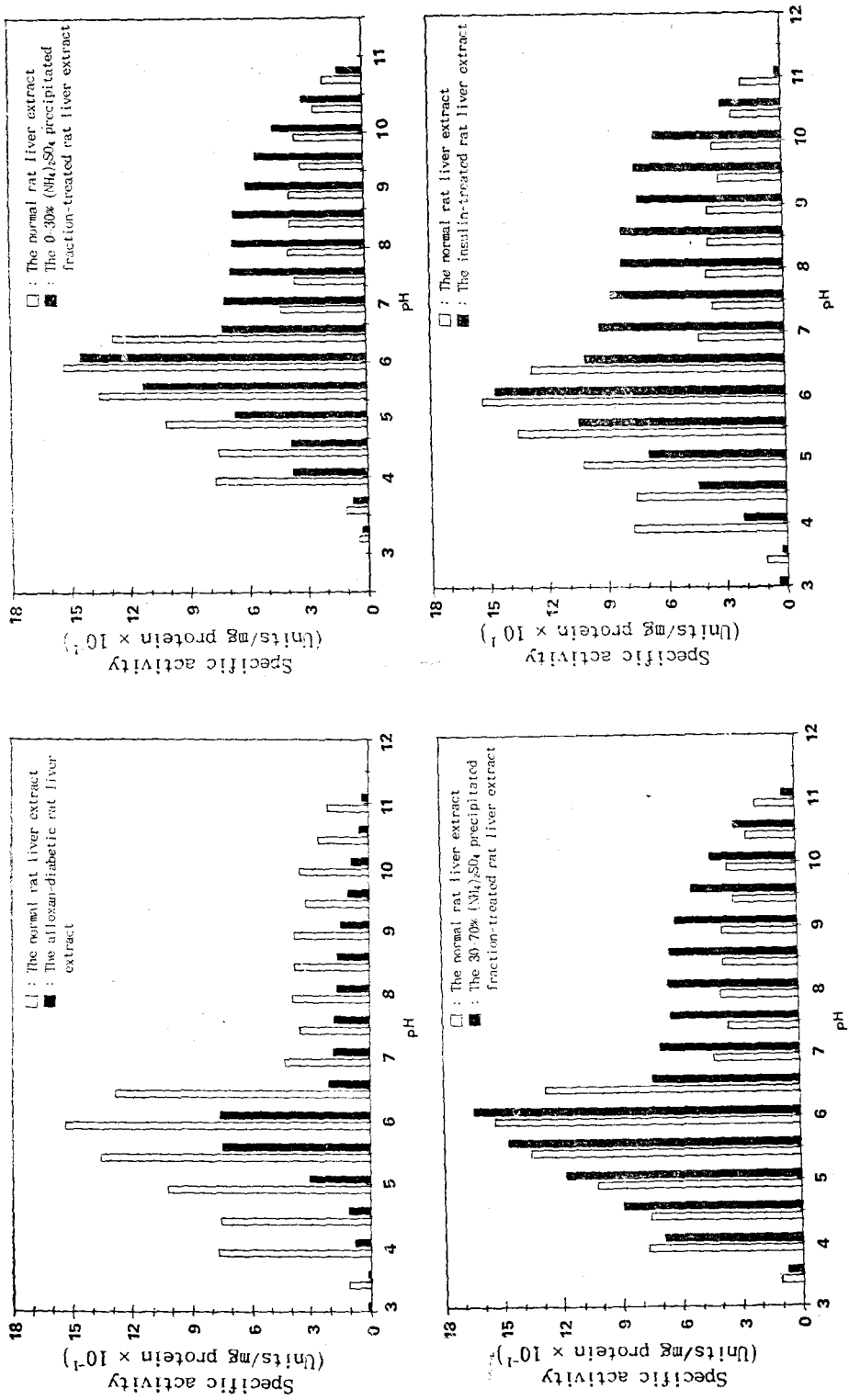


Fig. 2. The profile of pH dependency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) activities of rat liver extracts in the alloxan induced diabetic rats. The bars represent the specific enzyme activities of G-6-P DH for each group.

G-6-P DH는 정상군과 거의 같은 기질 친화도를 회복하는 것으로 보였다.

2. Optimum pH

효소 활성이 최적치를 나타낼 수 있는 기질의 농도와 조효소를 반응용액으로 하여 각기의 최적 pH를 측정할 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

모든 실험군에서 효소 활성은 pH 6에서 최대치를 나타내었으며 pH 6보다 낮거나 높은 pH에서는 감소됨을 볼 수 있었다. 그러나 한가지 특이할 것은 정상군이나 당뇨 유발군에서와는 달리 닭의장풀 추출액 분획이나 인슐린 투여군에서는 pH 7 이상의 알카리성에서의 효소활성의 감소가 매우 느리게 일어난다는 것이다. 정상군이나 당뇨 유발군의 경우 pH 7 이후의 효소활성이 pH 6에서의 최대값의 20% 이하인데 반하여 닭의장풀 추출 분획이나 인슐린 투여군의 경우 pH 9가 되는 알카리성에서도 50% 정도의 효소활성을 유지하고 있다는 것이다. 이것이 효소의 3차구조의 변화에 기인한 것인지 또는 효소가 처한 미세 환경내의 변화 또는 간조직내의 다른 성분 때문에 활성부위의 손상이 보완되어지는 것인지는 알 수 없으나 G-6-P DH의 pH에 따른 활성도의 변화가 다소 다르게 나

타나는 것을 알 수 있었다.

3. Optimum temperature

온도변화에 따른 효소활성을 측정하여 G-6-P DH의 열내성을 측정하였다. 정상군 및 당뇨 유발된 대조군에서 뿐아니라 모든 실험군의 간조

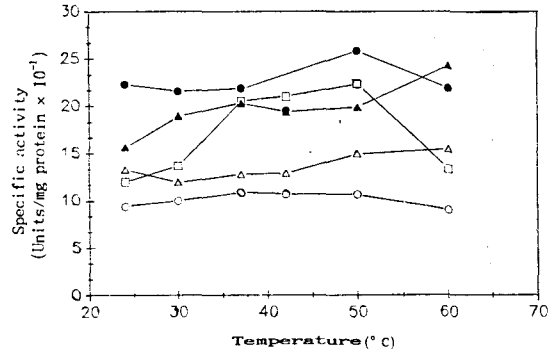


Fig. 3. The effect of temperature change on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) activities of rat liver extracts in the alloxan induced diabetic rats

(●: The normal rat liver protein fraction, ○: The alloxan-diabetic rat liver protein fraction, △: The 0~30% (NH₄)₂SO₄ precipitated fraction-treated rat liver protein fraction, ▲: The 30~70% (NH₄)₂SO₄ precipitated fraction-treated rat liver protein fraction, □: The insulin-treated rat liver protein fraction).

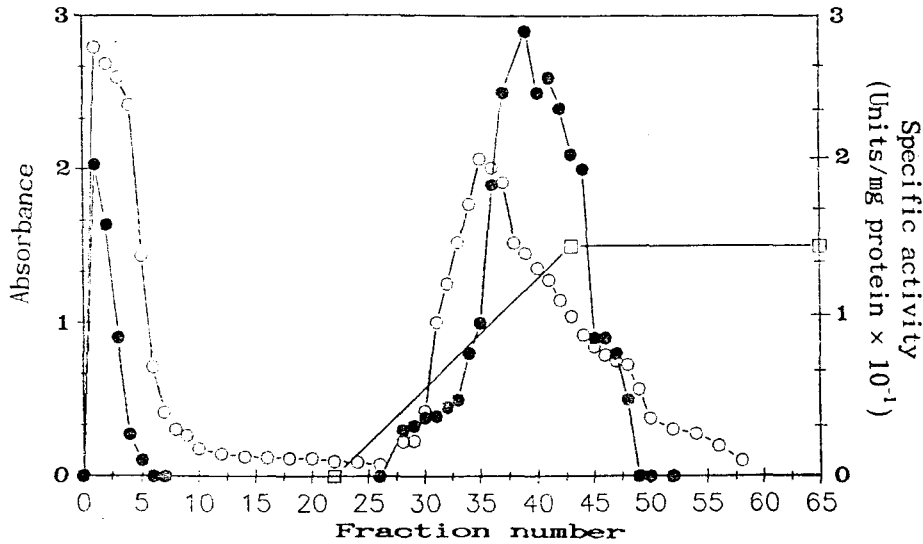


Fig. 4. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P DH) from rat liver extract by Cibacron Blue 4 B affinity chromatography

80% (NH₄)₂SO₄ precipitated fraction of rat liver extract was applied on a column equilibrated with 10 mM Tris·HCl buffer (pH 7.4). Elution of the bound protein was carried out with a 0~1 M linear potassium chloride gradient (○-○) in Tris·HCl buffer. Protein content (○-○) and G-6-P DH activity (●-●) were determined at 280 nm and 340 nm, respectively.

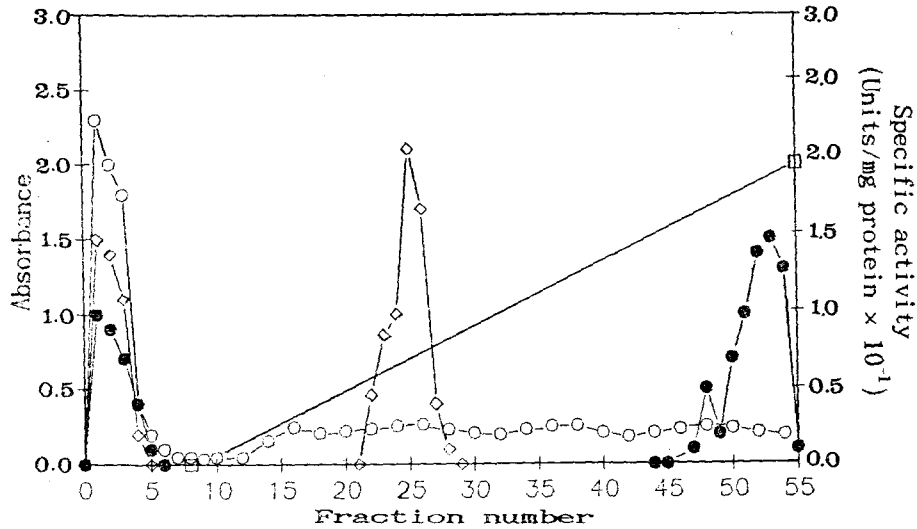


Fig. 5. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) and lactate dehydrogenase (LDH) from affinity-gel bound fraction by hydroxyapatite chromatography

Cibacron Blue 4 B affinity fractionate containing G-6-P DH activity was applied on a column equilibrated with 1 mM phosphate buffer (pH 6.8). Elution was carried out with a 1~150 mM linear phosphate gradient buffer (pH 6.8, \square - \square). Protein content (\circ - \circ), G-6-P DH activity (\bullet - \bullet), and LDH activity (\diamond - \diamond) were determined at 280 nm and 340 nm, respectively.

직내 G-6-P DH 효소활성은 20~60°C에 이르기까지 거의 같은 효소활성도를 나타내었다. 인슐린을 처리한 군의 간조직내 효소활성만이 20~30°C에서 낮은 온도나 60°C의 온도에서 활성이 반으로 감소됨은 보였으며 일반적으로 거의 모든 경우에 20~60°C에 이르기까지 효소활성을 그대로 유지하는 것으로 보아 G-6-P DH는 열에 대한 내성을 갖는 효소로 볼 수 있으며 이러한 열에 대한 내성은 당뇨 유발시에도 그대로 유지되는 것으로 생각되었다(Fig. 3).

C. G-6-P DH의 부분정제 및 단백질형태 연구

1. G-6-P DH의 부분정제

각 실험군의 간조직 추출액으로 부터 G-6-P DH 효소를 부분 정제하기 위하여 황화암모늄을 80% 농도가 되도록 가하여 얻은 침전분획을 탈염하고 Cibacron-Blue 4 B Sepharose Gel을 사용하여 affinity chromatography를 실시한 결과 두개의 peaks을 얻을 수 있었다(Fig. 4). 완충용액으로 용출된 unbound 분획 (peak I)과 0~1 M KCl을 linear gradient buffer로 용출한 bound 분획 (peak II)을 G-6-P DH 효소활성도를 측정된 결과 bound 분획 중 0.3 M KCl이

함유된 완충용액으로 용출된 분획에서 부터 효소활성을 나타내기 시작하였으며 이 분획을 모아 hydroxyapatite column chromatography를 실시한 결과 linear gradient 완충용액 (1~150 mM phosphate, pH 6.8)으로 용출하면 30 mM과 120 mM에서 각기 작은 peaks (peak I과 peak II)를 얻을 수 있었고 효소활성도 측정으로 peak I fraction은 LDH enzyme activity를 가지며 peak II fraction에서는 G-6-P DH enzyme activity를 나타내었다(Fig. 5).

2. ELISA 검정

각 실험군의 간조직에서 부분정제한 G-6-P DH의 항원성을 검정하기 위하여 ELISA를 시행한 결과 Fig. 6에서 알 수 있듯이 당뇨 유발군 간조직액의 항원-항체반응은 거의 나타나지 않았으며 닭의장풀 추출분획이나 인슐린 투여군의 간추출액내 효소의 ELISA 검정치는 각기 0.097, 0.096 및 0.118로서 정상군의 값인 0.102에 근접하게 회복됨을 알 수 있었다. 이로써 닭의장풀 단백질은 혈당강화 효과를 가질 뿐 아니라 간 조직내의 G-6-P DH 효소의 기질에 대한 친화도, 효소활성을 나타내는 최적 pH 및

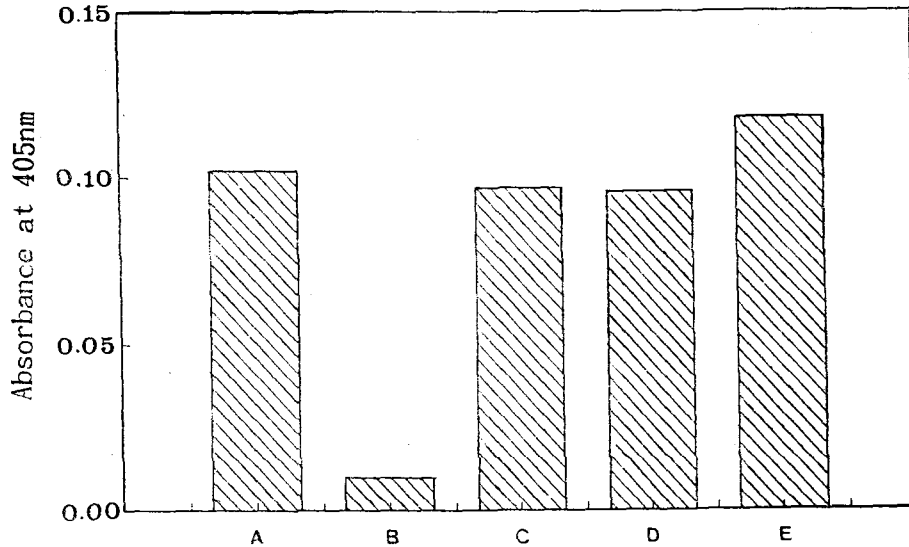


Fig. 6. ELISA assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) for rat liver extract in the alloxan induced diabetic rats

Experimental group A,B,C,D and E is normal, alloxan control, 0~30% (NH₄)₂SO₄ ppt. plant extract treated, 30~70% (NH₄)₂SO₄ ppt. plant extract treated and insulin treated, respectively.

온도, 그리고 항원성에 까지 영향을 미쳐서 당뇨 유발군의 간조직내에서의 당대사 관련 효소활성을 정상군의 것과 같도록 회복시키는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀—이 연구는 1990년도 한국과학재단 기초연구비로 이루어졌다. 이에 감사드립니다.

(1994년 1월 25일 접수 : 5월 11일 수리)

참 고 문 헌

1. Chung, M.H., Kim, Y.S., Moon, Y.H., and Lee, M.Y.: *Kor. J. Pharmacogn.* 11, 25 (1980).
2. Hong, N.D., Kim, J.W., Doo, H.K. and Kim, N.J.: *Kor. J. Pharmacogn.* 13, 26 (1982).
3. Hong, N.D., Rho, T.S., Kim, N.J. and Cho, B.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 18, 112 (1987).
4. Ivorra, M.D., Paya, M. and Villar, A.: *Planta Medica* 54, 282 (1988).
5. 김옥경 : 두릅나무근피 추출물의 혈당강하효과, 박사학위논문, 서울여자대학교 (1991).
6. Thierfelder, H. and Voncramn, E.: *Z. Physiol. Chem.* 105, 58 (1919).
7. Wolfgan, H., Wilfred, D., Klaus, L. and Herbert, L.: *Metabolism* 38 suppl. 1, 59 (1989).
8. Siamak, A.: *Metabolism* 38 suppl. 1, 89 (1989).
9. Hikino, H., Takahashi, M., Oshima, Y. and Konno, C.: *Planta Medica* 54, 1 (1988).
10. Villar, A., Paya, M., Hortigüela, M.D. and Cortes, D.: *Planta Medica* 43 (1986).
11. Hikino, H. and Mizuno, T.: *Planta Medica* 55 (1988).
12. Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C.: *Planta Medica* 55, 423 (1989).
13. 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울, p.597 (1980).
14. Goto, T., Dakase, S. and Kondo, T.: *Tetrahedron Lett.* 2413 (1978).
15. Baek, S.H., Seo, W.J. and Jin, K.D.: *Yakhak Hoeji* 34, 64 (1990).
16. Baek, S.H., Seo, W.J., Bae, K.W. and Jin, K.D.: *Yakhak Hoeji* 34, 34 (1990).
17. Steer, K.A., Sochor, M. and Mclean, P.: *Diabetes* 34, 485 (1985).
18. Adamo, M., Shemer, J., Aridor, M., Dixon, J.,

- Carswell, N., Bhathena, S.J., Michaelis IV, O.E. and Leroith, D.: *J. of Nutrition* 119, 484 (1987).
19. Roman-Ropez, C.R. and Allred, J.B.: *J. of Nutrition* 117, 1976 (1987).
20. Lazarow, A.: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 61, 280 (1946).
21. Al-Awadi, F.M., Khattar, M.A., and Gumaa, K.A.: *Diabetologia* 28, 432 (1985).
22. Demoss, R.D.: *Methods in Enzymology* I, Academic Press, New York, p.330 (1962).
23. Smith, P.K., Kohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: *J. Anal. Biochem.* 150, 76 (1985).
24. Chooi, Y.O., Byun, S.M., and Han, M.H.: *J. Korean Biochem.* 12, 147 (1979).
25. Neilands, J.B.: *Methods in Enzymology* I, Academic Press, New York, p.449 (1962).
26. Levin, O.: *Methods in Enzymology* V, Academic Press, New York, p.27 (1962).