

상엽의 혈당강하 활성

이주선 · 최명현 · 정성현*

경희대학교 약학대학

(Received February 17, 1995)

Blood Glucose-Lowering Effects of *Mori Folium*

Ju Seon Lee, Myung Hyun Choi and Sung Hyun Chung[†]

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract—*Mori Folium* (MF) methanol extract and its water soluble fraction showed significant blood glucose lowering effects alloxan-induced hyperglycemic mice. Their hypoglycemic activities seemed to nothing to do with the stimulation of insulin release or insulin-like action, according to our experiments. On the other hand, MF prevents the hyperglycemic responses from an oral load of starch and glucose in vivo. Since complex carbohydrates present in a diet must be degraded to monosaccharides by α -glucohydrolase before being absorbed in the gastrointestinal tract, it is thought that blood glucose lowering effects of MF may be related to the inhibition of α -glucohydrolase catalyzed enzymatic reaction. In addition, experiments that examined an effect of MF water soluble fraction on gastrointestinal movement showed no significant GI movement inhibitory effect. In conclusion, MF water soluble fraction may possess active component which is a potential candidate as an orally active agent for the treatment of diabetes mellitus.

Keywords □ *Mori Folium*, blood glucose lowering effect, α -glucohydrolase, diabetes mellitus

당뇨병(diabetes mellitus)은 고혈압의 경우와 유사하게 대부분의 경우 초기 증상이 뚜렷하지 않아 환자가 신이 질병을 앓고 있음을 알지 못하는 사이에 점차 병이 진행되는 경우가 허다하다. 이와같은 성인병을 적절하게 치료하지 않고 그대로 방치할 경우 종종 돌이킬 수 없는 합병증의 발병으로 치료가 더욱 어려워진다. 당뇨병을 오래 앓은 환자들은 때때로 눈, 신장 및 신경계에 치명적인 합병증을 일으켜 당뇨병성 망막증의 경우는 녹내장과 함께 실명의 대표적인 원인이 되고 있다. 따라서 당뇨병 환자의 혈당을 정상수준으로 낮추어 주는 일은 매우 중요한 일로 임상에서는 식이요법, 운동요법과 함께 필요한 경우 약물요법을 시도함으로써 혈당을 낮추려고 한다.

현재 임상에서 당뇨병치료 목적으로 사용되는 약제로는 인슐린과 경구용혈당강하제들이 있다. 후자에 속하는 약물로는 일반적으로 비만인 환자에 적용하는 바이구아나이드계통의 약물인 metformin과 비만 하지 않는 환

자에 적용하는 설폰닐우레아계통의 약물들이 흔히 쓰이고 있는데 이들 약물들은 각각 lactic acidosis와 저혈당의 부작용을 일으키는 단점을 지니고 있다. 작년 우리나라에서 시판이 허용된 acarbose(Glucobay[®])라는 약물은 다당류가 소장에서 가수분해되어 식후혈당을 상승시키는데 관여하는 효소인 α -glucohydrolase를 저해하는 기전의 약물로 최근 일본에서도 같은 기전의 약물인 Basen정이 시판되어 이같은 새로운 기전의 약물이 당뇨병치료제 시장을 이끌고 있다.¹⁻⁴⁾

Hikino 등은 1985년 상백피로부터 당단백질인 Moran A 라는 물질을 분리하여 이것이 혈당강하활성 물질임을 발표한 바 있으며,⁵⁾ 최근에 Basent등은 아르헨티나산 뽕나무잎(*Morus insignis*)의 에칠아세테이트 및 부탄올분획이 혈당강하활성을 나타낸다는 사실과 이 분획으로부터 두개 새로운 화합물인 2-aryl-benzofuran 유도체들을 분리함을 보고한 바 있으나⁶⁾ 이들은 논문에서 어느 물질이 혈당강하작용을 나타내는 유효성분인지를 밝히지 못했고 또한 이들이 행한 동물실

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

험의 경우 실험방법 및 그 결과의 해석에 애매한 점이 많고 더욱이 본 연구실의 결과와 일치하는 부분이 없다. 본 연구실에서는 상엽이 혈당강하작용이 acarbose와 마찬가지로 탄수화물의 소화와 관여하는 효소인 α -glucohydrolase 억제작용에 기인하다는 사실을 밝혔고 활성물질이 water-soluble 분획에 있음이 확인된 바 이제까지 상엽으로부터 이러한 작용기전에 관한 그리고 물가용부로부터 혈당강하물질의 분리에 대한 문헌상의 보고는 없는 실정이어서 본 연구를 진행하게 되었다. 여기서는 이제까지 본 연구실에서 얻은 결과의 일부를 정리하여 발표하고자 한다.

실험재료

실험동물 - 본 실험에서 사용한 실험동물중 흰쥐의 경우 체중 150-200 그램의 SD계를 그리고 생쥐의 경우는 체중 15-25 그램의 ICR계를 구입하여 사용하였고, 각 실험을 실시하기전 주위환경에 동물들이 잘 적응할 수 있도록 적어도 일주일전부터 실험실내의 동물장에서 사육하였다. 이때 고행사료와 물은 이들이 자유롭게 먹도록 충분히 공급하였다.

시약 - 본 실험에서 비교약물로 사용한 chiorpropamide, glibenclamide 및 acarbose는 한국화이자, 한독약품 및 바이엘코리아에서 공급받아 사용하였으며 alloxan과 streptozotocin은 Sigma로부터 구입하였고 그의 시약들은 시판 특급 혹은 일급을 사용하였다. 한편 인슐린측정용 RIA kit는 일본의 Eiken사로부터 구입하여 사용하였다.

기기 - One-Touch Lifescan(Johnson & Johnson), pH meter(Hanna RS-232), γ -scintillation counter(Packard 5000), Table top centrifuge(Vision 6000CF) Spectrophotometer(Hitachi U 3210), Ultracentrifuge(Beckman J2-21)

실험방법

시료의 제조 - 잠엽시험장으로부터 얻은 상엽을 추출에 적합하도록 분쇄한후 일정량을 평량하여 등근 플라스크에 넣고 시료가 잠기도록 80% 메탄올을 넣고 환류냉각기를 장치하여 수욕상에서 3시간동안 4회 추출한 후 온시 여과하였다. 여액을 모아 감압하여 회전농축기를 사용하여 용매를 날려보낸후 수득량을 계산하였

다.

한편 위에서 얻은 메탄올엑스 일정량에 증류수를 가하여 현탁시킨 다음 분액여두에 넣고 증류수와 동량의 다이클로로메탄을 가하여 진탕한 후 방치시켜 수층과 유기층을 분획하였다. 다이클로로메탄(하층부)을 따로 취한후 수층에 다시 동량의 다이클로로메탄을 가하여 같은 방법으로 분획하여 다이클로로메탄층이 거의 무색이 될 때까지 분획하였다. 이렇게 하여 얻은 다이클로로메탄층을 합하여 5°C이하에서 감압농축하여 유기층분획으로 하였다. 한편 수층의 경우도 감압농축한후 8°C의 건조기내에서 환전 건조시켜 수층분획으로 하였다.

고혈당 생쥐를 이용한 혈당강하 활성검색 - 고혈당을 유발시키는 물질로 알려진 alloxan⁷⁾을 생쥐 kg 몸무게 당 75 mg을 꼬리정맥을 통하여 투여한 후 48시간에 혈당을 측정하여 그 수치가 250 mg/dl 이상 450 mg/dl 이하인 생쥐들을 선별하여 본 실험에 사용하였다. 상엽메탄올엑스를 300 mg/kg 용량을 매일 아침 9일간 하루에 한번씩 정시에 경구투여하였고 한편 3일 간격으로 혈당을 측정하는 날에는 시료를 경구투여한지 한시간후 혈당측정기를 이용하여 혈당을 측정하였다. 한편 상엽 수층과 유기층 분획의 경우는 각각 500 mg/kg 용량으로 5일간 투여한 후 혈당을 측정하였다.

고혈당 흰쥐를 이용한 당부하실험^{8,9)} - 본 실험에서는 STZ(streptozotocin: 60 mg/kg ip)로 고혈당을 유발시킨 흰쥐를 하룻밤 절식시키고 상엽 수층을 500 mg/kg 용량으로 일회 경구투여하고 1시간 후에 포도당 3g/kg을 경구투여하여 당을 부하시킨 후 일정한 시간간격으로 혈당치 및 인슐린 분비량의 변화 양상을 대조군과 비교하였다. 이때 serum내의 인슐린량은 RIA kit를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 혈액중의 인슐린양을 측정하기 위해 heparin처리없이 흰쥐의 안와정맥으로부터 혈액을 취하고 시험관의 기벽을 따라 약하게 저어준 후 원심분리하여 serum을 얻었다. serum 또는 인슐린표준액을 ¹²⁵I-insulin 및 anti-insulin serum 이 담긴 시험관에 넣은 후 4°C에서 16-24시간동안 incubation 시킨 다음 second antibody를 가하고 다시 4°C에서 30분동안 incubation시켰다. 2,000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 흡인제거 후 시험관기벽에 남은 것을 γ -scintillation counter로 인슐린 표준액을 이용하여 만든 검량곡선으로부터 검체내의 인슐린량을 측정하였다.

α -glucohdrolase 효소 억제활성검색^{10,11)} - 다당류 분자내의 α -1, 4결합 분해에 관여하는 효소인 α -glu-

cohydrolase에 대한 상엽의 억제효과를 검색하기 위해 하룻밤 절식시킨 생쥐에 탄수화물원으로서 각각 전분(2 g/kg), 서당(4 g/kg), 포도당(1 g/kg)과 상엽수층 400 mg/kg을 동시에 경구투여하고 전분의 경우는 50분 후에, 서당은 40분 후에 그리고 포도당은 10분 후에 혈당을 측정하였다. 한편, 시험관 내에서의 α -glucohydrolase 효소에 대한 억제효과를 검색하기 위해 서당의 농도를 일정비율로 증가시키면서 상엽 수층 분획 두가지 농도에서 포도당 생성 억제를 관찰하였다. 본 실험에서 사용한 효소용액의 제조방법은 다음과 같다: 수컷 흰쥐(150-200 g)를 하룻밤 절식시켜 사혈치사시킨 후 소장전체를 취했다. Ice상에서 생리식염수로 장 내용물을 세척한 후 소장 안쪽의 점막층을 모아 0.5 M NaCl, 0.5 M KCl 5mM EDTA(pH 7.0)로 구성된 완충액을 가하여 현탁시켰다. 이를 homogenation한 뒤 20,000 g에서 30분동안 원심분리시켜 이 때 얻어진 pellet에 다시 완충액을 가하고 이 과정을 한번 더 반복하였다. 마지막에서 얻은 pellet에 5배의 생리 식염수를 가한 후 2,000 g로 10분동안 원심분리시키고 이때 탁한 부분의 supernatant를 효소용액으로 사용하였다.

장관운동 억제활성검색¹⁰⁾ - 식후혈당이 낮아지는 경우 α -glucohydrolase의 억제작용과는 관계없이 장운동 억제로 인한 흡수 억제로 혈당강하효과를 나타낼 수

도 있으므로 본 실험에서는 상엽의 수층 및 유기층에 대해 장운동에 대한 억제 효과의 유무를 관찰하였다. 이를 위해 활성탄을 0.5% methyl cellulose에 현탁시켜 10% 현탁액을 만들고 각각의 검체는 300~600 mg/kg로 증류수에 녹여 사용하였다. 검체를 경구투여후 10분에 활성탄 현탁액을 경구투여하고 다시 10분후 단 두하여 생쥐를 희생시킨 다음 장전체의 길이에 대한 활성탄의 이동정도로 그 억제효과를 평가하였다.

결과 및 고찰

시료의 제조 - 상엽 분쇄물 3 kg을 80% 메탄올로 추출하여 410.4 g을 얻어 약 14%의 수득율을 나타냈다. 이어 상엽 메탄올엑스 15 g에 증류수 150 ml을 가하여 현탁시킨 다음 500 ml용 분액여두에 넣고 증류수와 동량의 다이클로로메탄을 가하여 진탕한 후 방치시켜 수층과 유기층으로 나뉘었을 때 비중이 큰 다이클로로메탄층이 거의 무색이 될 때까지 다이클로로메탄을 가하여 분리조작한 후 각각을 건조하였고 이를 3회 더 반복하여 총 상엽 메탄올엑스 60 g으로부터 수층분획은 45 g을 얻어 75%의 수득율을 나타내었다.

고혈당 생쥐를 이용한 혈당강하 활성검색 - 메탄올엑스 수준에서 혈당강하 작용을 검토한 결과 상엽에

Table I — Blood glucose lowering effect of *Mori Folium* methanol ex in alloxan-induced hyperglycemic mice

Group	Dose (mg/kg)	number of mouse per group	Day after induction of diabetic condition			
			0	3	6	9th
Normal	-	8	120± 4.7	113± 4.4	115± 4.4	117± 4.5
Diabetic control*	-	8	316± 13.2	312± 16.3	320± 18.8	290± 17.4
<i>Mori Folium</i>	300	8	375± 19.7	277± 19.4***	293± 20.9**	297± 18.3**
Chlorpropamide	25	8	282± 9.7	319± 11.2	279± 9.4	244± 9.2**

* Alloxan was given i.v. at a dose of 75 mg/kg

** p < 0.05. *** p < 0.01 significantly different from the 0 day values

Table II — Comparison of blood glucose lowering effects between water- and dichloromethane-soluble fractions obtained from *Mori Folium* methanol ex.

Group	Dose (mg/kg)	number of mouse per group	Day after induction of diabetic condition	
			0	5th
Normal	-	5	84.2± 7.7	112.8± 5.1
Diabetic control*	-	5	415.8± 28.8	411.4± 22.2
Water fr.	500	5	510.6± 18.7	424.4± 11.3**
Dichloromethane fr.	500	5	431.3± 15.5	381.0± 37.3

* Alloxan was given i.v. at a dose of 75 mg/kg

* p < 0.1. ** p < 0.05 significantly different from the 0 day values

서 초기에 급하게 혈당이 감소되고 그 감소된 혈당이 유지되는 다소 특이한 양상으로 혈당강하작용을 보였다 (Table I). 또한 수층과 유기층 분획의 경우 수층에서 95%의 유의성을 나타내며 혈당강하작용을 보인 반면 유기층의 경우는 유의성있는 혈당강하 활성을 나타내지 못하였다 (Table II). 이후 실험은 상업 수층을 가지고 혈당강하 기전 연구를 계속하였다.

고혈당 흰쥐를 이용한 당부하실험 - STZ로 고혈당을 유발시킨 흰쥐의 경우 당부하로 인해 상승된 혈당치가 시간이 경과함에 따라 낮아지는 경향을 비교해 본 결과 현재 임상에서 경구용 혈당강하제로 사용중에 있는 glibenclamide의 경우 부하된 당을 낮추는 효과가 큰 데 비하여 상업수층 투여군에서는 대조군과 큰 차이를 나타내지 못하였다 (Fig. 1). 이때 함께 관찰한 인슐린 양에서는 상업 수층 투여군은 당뇨유발 대조군과 큰 차이를 볼 수 없었다 (미발표 자료). 이 결과로 부터 상업 수층의 혈당강하 활성은 인슐린 분비작용과는 다른 기전으로 사료되어 다음의 α -glucohydrolase 효소 활성 억제효과를 검색하였다.

α -glucohydrolase 효소 억제활성 검색 - 당뇨병치료에 있어서 이상적인 방법은 투여된 약물에 의하여 식후 혈당이 잘 조절되는 반면 약물투여로 인한 과도한 저혈

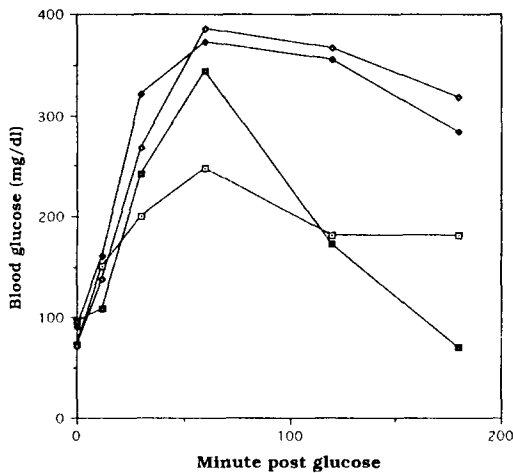


Fig. 1—Effects of *Mori Folium* water soluble fraction on blood glucose after an oral glucose load in STZ-induced diabetic rats. Results are expressed as mean plasma glucose from rats orally dosed with MF water soluble fraction (◆) and glibenclamide (□). ◆ and □ represent diabetic control and normal groups, respectively.

당을 일으키지 않아야 한다. 이러한 면에서 α -glucohydrolase 효소 억제제들은 기존의 다른 당뇨병치료제와는 달리 저혈당은 유발시키지 않으며^{1,2)} 불필요한 인슐린 분비를 감소시켜 인슐린 비의존성 당뇨병 환자에게 그 분비능력을 유지시켜 주는 새로운 기전의 당뇨병치료제로 기대된다. 본 연구에서는 스크리닝단계에서 우수한 혈당강하 활성을 보였던 상업이 이 효소에 대해 억제 활성이 있는지를 *in vivo* 및 *in vitro*에서 검토하였고 다음의 결과를 얻었다. 상업 메탄올엑스를 유기층과 수층으로 분획한 후 한가지 농도(400 mg/kg)에서 서당과 전분의 분해억제를 실험하여 본 결과 상업의 물분획에서는 전분에 대하여 95%의 유의성있는 억제효과가 관찰되었다. 한편 서당에 대하여는 억제효과는 보였으나 유의성은 나타내지 못하였다. 효소 작용과는 무관하게 흡수되는 포도당의 경우는 예상하였던 대로 상업투여군과 대조군 사이에서 유의성있는 차이를 나타내지 못하였다 (Fig. 2). 한편 전분분해에 의한 포도당의 생성 억제활성에 대해 상업 수층 분획을 농도별로 투여해 본 결과 200 mg/kg 투여군에서는 유의한 억제효과를 못 보인 반면 400 및 800 mg/kg을 투여받은 군에서는 95%의 유의성있는 억제효과를 나타내었다 (Fig. 3).

실험관내에서 효소 기질로서 서당을 사용하고 상업 수층의 농도에 변화를 주며 효소억제작용을 검토하여 본 결과 농도의존적으로 억제작용이 나타남을 알 수 있

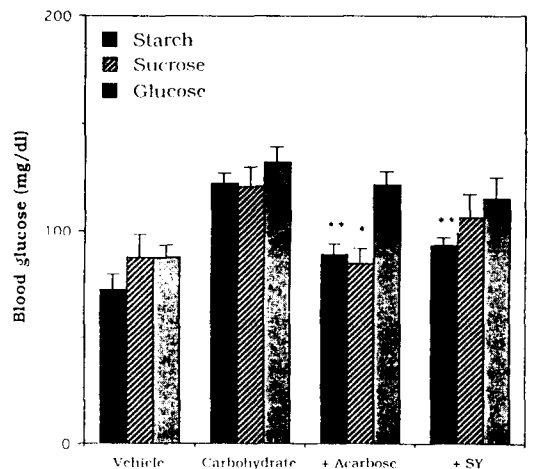


Fig. 2—Effects of *Mori Folium* water soluble fraction (SY) and acarbose on blood glucose from oral loads of carbohydrates in mice. * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$ significantly different from the control value.

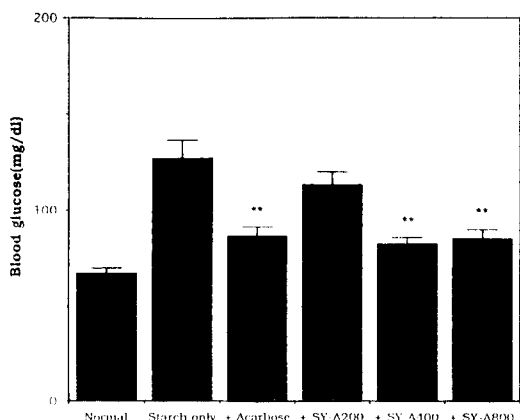


Fig. 3—Effects of three different concentrations of *Mori Folium* water soluble fraction (SY) and acarbose on blood glucose from an oral load of starch in mice. **p<0.05 significantly different from the control value.

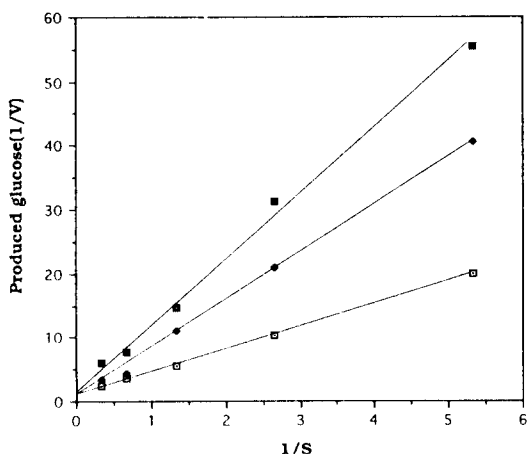


Fig. 4—Inhibition of rat intestinal α -glucohydrolase by *Mori Folium* water soluble fractions. Inhibition was presented as double reciprocal plots. The concentrations of MF water soluble fractions used were : 0 (□), 0.5 μ g (◆), 5 μ g (□), (S) is sucrose concentration, which was 1.74, 3.48, 6.97, 13.94 and 27.88 mM.

Table III—Effect of *Mori Folium* water-soluble fractions on gastrointestinal motility

Group	Dose (mg/kg)	Movement of active carbon(%)
Normal	-	100.0±3.05
	300	111.0±2.02
Water fr	600	101.6±4.76
Buscopan	10	67.5±8.76*

** p<0.05 significantly different from the normal value

었고, 이를 Lineweaver Burk-plot으로 나타내었을 때 세 직선이 Y축선에 만나는 것으로 보아 경쟁적인 억제양상을 관찰하였다(Fig. 4).

장관운동 억제활성검색 - 상엽 수층은 두가지 농도 (300 및 600 mg/kg) 모두에서 증류수만 투여한 대조군과 유사하게 장관운동이 진행되었다(Table III).

이상의 결과로부터 서당부하시 상엽 수층의 혈당강하 작용은 α -glucohydrolase 효소반응의 억제에 기인되는 것으로 사료되며 한편 장관운동에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

결론

본 연구를 통해 상엽의 혈당강하효과를 검토하여 본 결과 다음의 결론을 얻었다.

첫째, 상엽은 인슐린 분비촉진이나 인슐린 유사작용과는 달리 그 혈당강하작용이 장내 탄수화물을 분해하는 효소(α -glucohydrolase)를 억제하는 것임을 알 수 있었다.

둘째, 작용성분을 추적하기 위해 분획하여 본 결과 혈당강하작용이 유기층분획이 아닌 물분획에서 나타나 활성물질이 친수성일 것으로 추측된다.

셋째, 상엽수층의 혈당강하작용은 장관운동 억제에 의한 흡수억제기전은 아님을 확인할 수 있었다.

네째, Lineweaver Burk-plot을 통해 나타난 결과로부터 이 효소의 활성부위에 기질과 경쟁적으로 결합할 수 있는 구조적 요소를 갖춘 물질이 상엽 수층내에 존재할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처 주관 '93-94 선도기술개발사업 연구비 그리고 주식회사 녹십자 연구비에 의해 수행되었으며 이에 관련 기관에 깊은 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Tattersall, R.: α -glucosidase Inhibition as an Adjunct to the Treatment of Type 1 Diabetes. *Diabetic medicine* **10**, 668 (1993)
- 2) Toeller, M: Nutritional Recommendation for Diabetic Patients and Treatment with α -glu-

- cosidase Inhibitor. *Drugs* **44** (suppl. 3), 13 (1992).
- 3) Levovitz, H. E.: Oral Antidiabetic Agents: The Emergence of α -glucosidase Inhibitor. *Drugs* **44** (suppl. 3), 21 (1992)
- 4) Hollander, P.: Safety Profile of Acarbose, an α -glucosidase Inhibitor. *Drugs* **44** (suppl. 3), 47 (1992).
- 5) Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y. and Konno, C.: Isolation and hypoglycemic activity of Moran A, a glycoprotein of morus alba Root Barks. *Planta medica* **159** (1985).
- 6) Basnet, P., kadota, S., Terashima, S., Shimizu, M. and Namba, T.: Two New 2-Aryl-benzofuran Derivatives from Hypoglycemic Activity-Bearing of Morus insignis. *Chem. Pharm. Bull.* **41** (7), 1238 (1993).
- 7) Weaver, D. C., Mcdaniel, M. L., Naber, S.P., Barry, D. and Lacy, P.E.: Alloxan Stimulation and Inhibition of Insulin Release from Isolated Rat Islets of Langerhans. *Diabetes* **27** (12), 1205 (1978).
- 8) Junod, A., Lambert, A. E., Strauffacher, W. and Renold, A.E.: Diabetogenic Action of Streptozotocin: Relationship of Dose to Metabolic Response. *J. Clin. Invest.* **48**, 2129 (1969).
- 9) Bonner-weir, S., Trent, D. F., Honey, R. N. and Weir, G. C.: Responses of Neonatal Rat Islets to Streptozotocin. *Diabetes* **30**, 64 (1982).
- 10) Rhinehart, B. L., Robinson, K. M., Liu, P. S. Payne, A. J., Whetley, M. E. and Wagner, S. R.: Inhibition of Intestinal Disaccharidases and Suppression of Blood glucose by a New α -glucohydrolase Inhibitor-MDL 25, 637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241** (3), 915 (1987).
- 11) Robinson, K. M., Begovic, M. E., Rhinehart, B. L., Heineke, E. W., Ducep, J. B., kastner, P. R., Marshall, F. N. and Danzin, C.: New potent α -Glucohydrolase Inhibitor-MDL 73, 945 with Long Duration of Action in Rats. *Diabetes* **40**, 825 (1991).
- 12) Hillebrand, I. and Boehme, K.: Clinical studies on acarbose during 5 years. In Creutzfeldt W(Ed) Proceedings of First International Symposium on Acarbose, Montreux, October, 1981, p445, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982.