

잠뇨의 흰쥐 소장내 glycosidase 저해활성

송주경 · 정성현*

경희대학교 약학대학

Inhibitory Effect of Silkworm Urine on the Rat Intestinal Glycosidase

Ju Kyung SONG and Sung Hyun CHUNG*

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

(Received August 12, 1998; accepted September 15, 1998)

Abstract – The inhibitory activities of Amberlite active fraction, which was obtained from methanol soluble fraction of freeze dried silkworm urine, on the rat intestinal glycosidase-catalyzed enzymatic reaction were examined in *in vitro* and *in vivo* experiments. Amberlite active fraction showed significant inhibitory effects on the hydrolysis of α -glycosidic bond, especially α -1,4 bond. On the other hand, the inhibition on the hydrolysis of β -glycosidic bond was very weak. Oral administration of Amberlite active fraction resulted in a dose-dependent decrease in the blood glucose after an oral maltose load, and postprandial hyperglycemia in carbohydrate-loaded mice was suppressed by Amberlite active fraction at 60 mg/kg in decreasing order of maltose, starch, sucrose and lactose. 60 mg/kg of Amberlite active fraction lowered the blood glucose level markedly after 18, 35, and 60 min after an oral maltose load and the antihyperglycemic activity was maintained upto 90 min. In alloxan-induced hyperglycemic mice, Amberlite active fraction at a dose of 100 mg/kg also significantly lowered blood glucose after an oral maltose load, and its efficacy was almost equivalent to that of acarbose.

Keywords □ Silkworm urine, glycosidase inhibitor, Amberlite active fraction, postprandial hyperglycemia

누에는 「누어 있는 벌레」라는 말에서 유래된 것으로 天蟲 즉 「하늘의 벌레」라고도 한다. 누에는 원래 야생 뽕나무 잎을 먹는 해충이었으나 사람들이 누에의 비단실을 이용하기 위해 오랫동안 집에서 기르는 과정에서 야성을 잃고 인류사회에 크게 이바지하는 자원곤충이 되었다. 오늘날 누에는 비단뿐 아니라 여러 가지 유용한 물질을 인간에게 제공하여 주며, 현재 일본 등 잠업 선진국에서는 누에는 물론 뽕잎 등을 이용한 기능성 물질의 개발과 같은 비섬유 분야 연구가 활발히 수행되고 있다.

정성현 등(1996)은 5령 3일의 누에 동결건조 분말이 ICR 계 생쥐와 건강한 지원자에서 소장내 α -glycosidase 효소반응을 저해함으로써 포도당의 흡수를 저해하는 활성이 있음을 보고한 바 있고 최근에는 「누에분말을 유효성분으로 포함하는 혈당강하제 및 그의 제조방법」이라는 발명이 국내 및 일본에서 특허 등록이 되기도 하였다(정성현 등, 1998).

5령 3일의 누에는 수분 4.8%, 조단백질 56.8%, 조지방 9.3%, 조섬유 6.6%, 조회분 9.1%로 이루어져 있으며 조지

방과 조단백질 함량은 뽕잎보다 월등히 많은 반면 조섬유와 조회분량은 뽕잎보다 적다. 누에는 애벌레동안 별도의 오줌을 배설하지 않고 단지 똥(잠분)으로 다소의 수분을 방출할 뿐이다. 이렇게 애벌레 기간을 지나게 되면 고치를 짓게 되는데 이 때 일생에 단 한번의 오줌(잠뇨)을 배설하게 된다(류강선과 정성현, 1998). 이러한 잠뇨는 과거 민간에서 이를 받은 종이를 태워 잿가루로 만들고 꿀로 개어서 만든 환을 입이 마르고 갈증이 나는 消渴症(지금의 당뇨) 치료에 사용하여 왔다. 이러한 사실에 근거하여 본 연구에서는 잠뇨의 소장내 α -glycosidase 효소반응에 대한 저해 유무를 시험관내와 생체내에서 기존의 glycosidase 저해제인 acarbose와 비교해 보았다.

실험재료 및 방법

실험동물

웅성 ICR계 생쥐(15-20 g)와 SD계 흰쥐(150-200 g) 및 고형사료는 (주)대한실험동물센터(충북 음성)에서 구입하여 사용하였다. 항온항습실(온도 25°C, 습도 50%)에서 자

* To whom correspondence should be addressed.

유로이 사료와 물을 공급하였고 본 실험실 환경에 1주일간 적응시킨후 건강상태가 양호한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

시약

Maltose, sucrose, lactose, isomaltose, glucose, alloxan, p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside, p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside, p-nitrophenyl β-D-galactopyranoside, Piperazine-N, N'-bis[2-ethansulfonic acid] (PIPES) buffer, Tris-HCl, mercaptoethanol, Trinder, Amberlite IR-120 PLUS(H⁺) 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 acarbose 는 바이엘 코리아로부터 공급받아 사용하였다. 그의 기타 유기용매는 시판 특급 혹은 일급시약을 사용하였다.

시료 및 효소액의 제조

Amberlite 활성분획의 제조

잠사곤충연구소로부터 얻은 1.5 liter의 잠노를 Whatman 여과지(No.1)로 여과하여 얻은 여액을 동결건조한 분말 50 g을 MeOH 3 liter에 넣고 하룻밤 교반한 후 여과하여 메탄올가용부를 얻었다. 여액은 rotary evaporator를 사용하여 감압건조하였다. 잠노 메탄올가용부 35 g을 Amberlite IR-120 PLUS cation column(H⁺ form, 3×110 cm)에 loading한 후 α-glycosidase 저해활성을 나타내는 활성분획은 0.5 M NH₄OH로 elution하여 얻었다. 이것을 Amberlite 활성분획이라 칭하고 이를 시료로 하여 동물실험을 하였다

잠노로부터 Amberlite 활성분획을 얻는 과정은 Scheme 1에 기재되어 있다.

흰쥐 소장 glycosidase 효소액의 제조

SD계 흰쥐소장으로부터 glycosidase 효소의 분리는 Rhinehart 등의 방법을 따랐다(Rhinehart 등, 1987). 웅성 흰쥐(150-200 g)를 하룻밤 절식시켜 사혈 치사시킨 후 소장 전체를 절취해 얼음 위에서 생리식염수로 장관용물을 세척하고 소장 안쪽의 점막층을 모아 0.5 M NaCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA로 구성된 완충액(pH 7.0)을 가하여 현탁시킨 후 균질화하였다. 이를 20,000 g에서 30분 동안 원심분리하

여 얻어진 pellet에 다시 완충액을 가하고 같은 과정을 일회 반복하였다. 마지막으로 얻은 pellet에 5배의 생리식염수를 가하고 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 이때 얻은 상층부유액을 본 실험의 효소액으로 사용하였다.

시험관내 α-glycosidase 저해활성 검색

효소 assay

서당, 맥아당 혹은 유당과 같은 천연기질을 이용한 효소 반응은 Trinder법을 따랐다(Asano 등, 1994). 곧 일정 농도의 시료(최종농도 2×10⁻², 2×10⁻³, 2×10⁻⁴%)를 50 mM PIPES buffer(pH 6.8), 10 mM 기질 및 소량의 효소액(이때 총 assay 볼륨은 60 μl)과 함께 37℃에서 30분간 반응시키고, 이때 가수분해된 포도당을 측정하기 위해 trinder 시약 1 ml을 가한 뒤 실온에서 18분간 방치 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

한편 p-nitrophenyl(PNP) glucopyranoside와 같은 인공기질(artificial substrate)을 이용한 효소반응은 Asano 등의 방법을 따랐다(Asano 등, 1996). 효소저해 활성의 유무를 측정할 시료를 50 mM PIPES buffer(pH 6.8), 3 mM substrate(효소에 해당하는 PNP α- 혹은 β-glucopyranoside) 및 효소액과 함께 37℃에서 30분간 반응시키고(총 assay 볼륨은 0.5 ml) 0.64% ethylenediamine(pH 10.7) 1 ml을 가하여 반응을 종결시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol을 400 nm에서 UV spectrophotometer로 흡광도를 측정하였고, 각 시료의 저해활성은 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = (A - B) / A \times 100$$

A : Absorbance without test sample

B : Absorbance with test sample

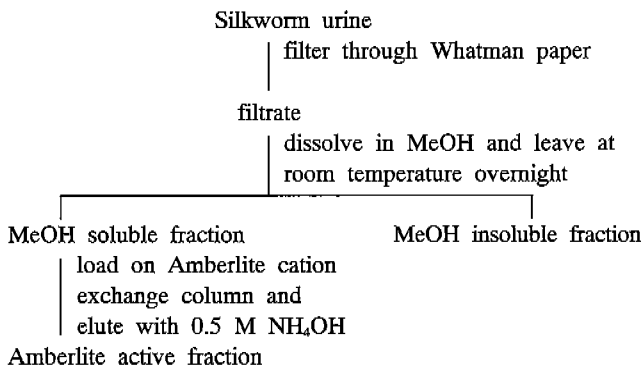
생체내 α-glycosidase 억제활성 검색

시료의 효소저해활성의 유무를 생체내에서 검색하기 위해 본 실험에서는 천연기질을 사용하여 glucose oxidase법을 이용한 혈당측정기구(One-Touch Lifescan)를 사용하였다(정성현 등, 1996; Marks와 Dawson, 1965).

정상마우스에서 시료의 α-glycosidase 저해활성

먼저 시료 용량에 따른 효소저해활성을 비교해 보기위해 마우스를 14시간 절식시킨 후 공복시 혈당을 측정하고 maltose(2 g/kg) 단독 혹은 maltose와 함께 Amberlite 활성분획을 40, 60, 80 mg/kg을 투여하고 35분 뒤 혈당을 측정하여 대조군과 비교시 시료의 용량에 따른 혈당상승 억제정도를 살펴보았다. 비교약물군에서는 maltose와 acarbose 50 mg/kg을 같이 투여하였다.

다음으로 시료의 기질에 따른 효소저해 활성과 포도당의 흡수에 미치는 영향을 검토하기 위해 마우스를 14시간 절식시킨 후 공복시 혈당을 glucose oxidase법으로 측정한 후 당(starch, sucrose, lactose, maltose, glucose 각 2 g/kg) 단독 혹은 당과 시료 일정량(Amberlite 활성분획 60 mg/kg)을 동



Scheme 1. Preparation of Amberlite active fraction from silkworm urine.

시에 투여한 후 혈당을 측정하였다. Sucrose, lactose, maltose는 투여 후 35분, glucose는 10분, starch는 60분 후에 혈당을 측정하여 대조군(당만 투여한 군)과 비교하여 시료의 혈당상승 억제정도를 살펴보았다. 비교약물군에는 당과 함께 acarbose 50 mg/kg을 사용하였다.

끝으로 시료 및 비교약물의 시간경과에 따른 효소저해활성을 비교하기 위해 14시간 절식시킨 마우스의 공복시 혈당을 측정한 후 maltose(2 g/kg) 단독 혹은 maltose와 함께 Amberlite 활성분획(60 mg/kg)을 경구투여하고 18분, 35분, 60분, 90분, 120분에 혈당변화를 관찰하였다. 비교약물군에서는 maltose와 acarbose 50 mg/kg을 동시에 투여하였다.

알록산유도 당뇨마우스에서 시료의 α -glycosidase 억제 활성

본 실험에서는 당뇨상태에서 당부하시 시료의 혈당상승 억제정도를 비교약물과 비교해 보기위하여 마우스를 14시간 절식시킨 후 알록산(75 mg/kg)을 정맥투여하여 고혈당 마우스를 유도하였다. 48시간뒤 혈당을 측정하여 혈당치가 250-400 mg/dl인 마우스만 선별하여 본실험에 사용하였다. 선별된 마우스를 16시간 절식시키고 공복시 혈당을 측정한 후 maltose(2 g/kg) 단독 혹은 maltose와 함께 Amberlite 활성분획(100 mg/kg)을 경구투여하여 35분 뒤에 혈당을 측정하였다. 비교약물군에는 maltose와 acarbose(100 mg/kg)를 동시에 투여하였다.

통계처리

모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 program을 사용하여 Student's t-test로 검증하였으며 이 때 유의수준은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

결과 및 고찰

시료의 제조

잠노 동결건조분말 50 g으로부터 메탄올가용분획 35 g을 얻었으며 이것을 Amberlite IR-120 PLUS 양이온 교환수지에 loading한후 0.1 M NH_4OH 로 elution하여 활성분획 2.5 g(수득율 7%)을 얻었다.

Amberlite 활성분획은 $2 \times 10^{-3}\%$ 와 $2 \times 10^{-4}\%$ 농도에서 glycosidase 저해활성을 시험관내에서 측정해 본 결과 Table I에서 보듯이 $2 \times 10^{-3}\%$ 농도에서 88%, $2 \times 10^{-4}\%$ 농도에서 73%의 높은 저해활성을 나타내었다.

각 분획의 수득율을 감안하여 효소저해 활성의 크기를 비교해 볼때 잠노내의 α -glycosidase 저해활성 성분은 대부분 메탄올가용부와 Amberlite 활성분획으로 이송되는 것으로 사료되며 따라서 이후 실험에서는 Amberlite 활성분획을 사용하였다.

시험관내 α -glycosidase 저해활성 검색

본 실험에서는 시험관내에서 천연기질과 인공기질의 가

Table I. In vitro inhibitory effects of silkworm urine and its subfractions on rat intestinal α -glycosidase

Treatment	% Con.	% Inhibition	
		2×10^{-3}	2×10^{-4}
Silkworm urine		23	8
MeOH soluble fraction		35	11
Amberlite active fraction		88	73

Table II. In vitro inhibitory activities of Amberlite active fraction on rat intestine glycosidase-catalyzed enzymatic reaction with different substrates

Substrate	% Concentration	% Inhibition		
		2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}
ρ -nitrophenyl α -D-glucopyranoside		92	81	70
ρ -nitrophenyl β -D-glucopyranoside		34	5	2
ρ -nitrophenyl β -D-galactopyranoside		19	13	11
Maltose		92	73	63
Isomaltose		89	84	45

수분해에 대한 Amberlite 활성분획의 저해정도를 농도별로 측정해 보았다. Table II에 나타난 바와 같이 Amberlite 활성분획은 이 실험에서 사용한 가장 낮은 농도인 $2 \times 10^{-4}\%$ 에서 ρ -nitrophenyl α -D-glucopyranoside, maltose, isomaltose, ρ -nitrophenyl β -D-galactopyranoside, ρ -nitrophenyl β -D-glucopyranoside 순으로 저해활성이 컸다.

이 결과로부터 Amberlite 활성분획은 α -glycosidic bond 가수분해에 보다 선택적인 저해활성이 있음을 알 수 있었고 또한 α -결합중에서도 isomaltose의 α -1,6 glycosidic bond보다 maltose의 α -1,4 glycosidic bond에 더 선택적인 작용이 있음을 알 수 있었다.

생체내 α -glycosidase 저해활성 검색

본 실험에서는 앞서 시험관내에서 α -glycosidic bond 분해에 강력한 저해활성을 보인 Amberlite 활성분획이 생체내에서도 glycosidase 효소반응에 저해활성이 있는지를 살펴보기 위해 정상쥐와 알록산유발 당뇨쥐를 이용하여 여러 조건하에서 실험해 보았다.

첫째, 정상 마우스에서 Amberlite 활성분획 40, 60, 80 mg/kg을 maltose와 함께 부하시 42%, 54%, 60%의 유의성 있는 용량의존적 혈당상승 억제효과를 보여주었다(Fig. 1). 한편 acarbose의 경우는 50 mg/kg 용량에서 maltose 부하에 대해 70%의 혈당상승 억제활성을 나타내었다. 이후 실험에서는 Amberlite 활성분획 60 mg/kg 용량을 사용하였다.

기질에 따른 효소저해활성 실험에서 Amberlite 활성분획은 60 mg/kg 용량에서 starch에 대해 51%, sucrose 41%, lactose 27%, maltose 67%의 혈당상승억제 효과가 있었고 반면 포도당을 투여하였을 때는 혈당상승억제작용이 없었다(Fig. 2). 한편 본 실험에서 positive control 약물로 사용한

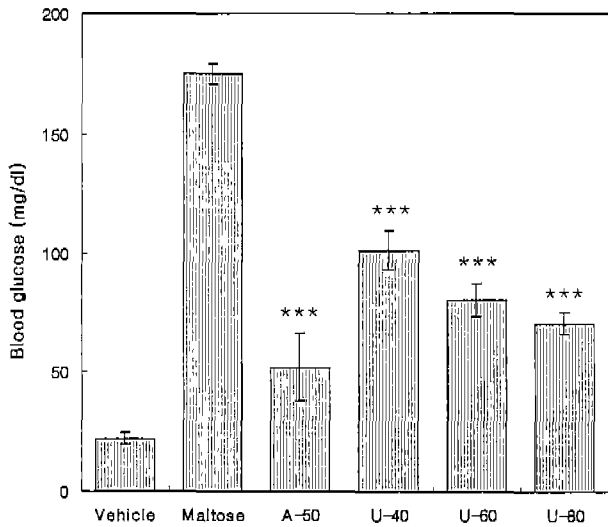


Fig. 1. Dose dependent inhibitory activity of Amberlite active fraction on blood glucose after an oral maltose (2 g/kg) load in mice. A-50 and U-40 denote acarbose-treated and Amberlite active fraction-treated groups respectively and the number after alphabet A or U means a dose administered. All values are mean \pm SE. ***Significantly different from the control value at $p < 0.01$.

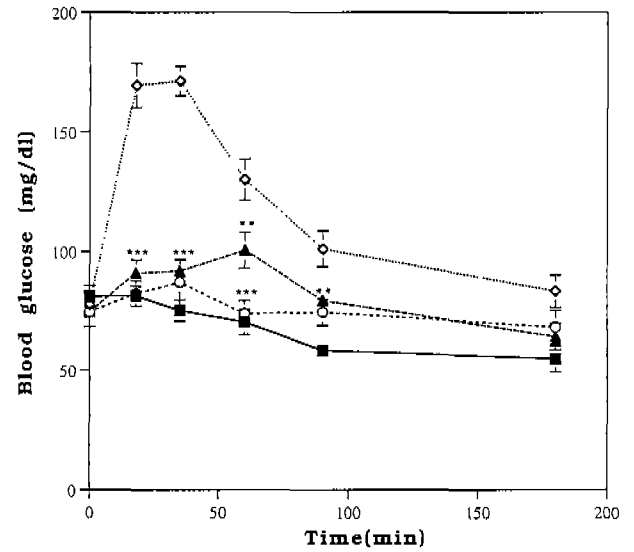


Fig. 3. Time dependent inhibitory activity of Amberlite active fraction on blood glucose after an oral maltose (2 g/kg) load in mice. Open diamond, open circle, closed triangle and closed square represent control, acarbose-treated, Amberlite active fraction-treated and vehicle, respectively. All values are mean \pm SE. **Significantly different from the control value at $p < 0.05$. ***Significantly different from the control value at $p < 0.01$.

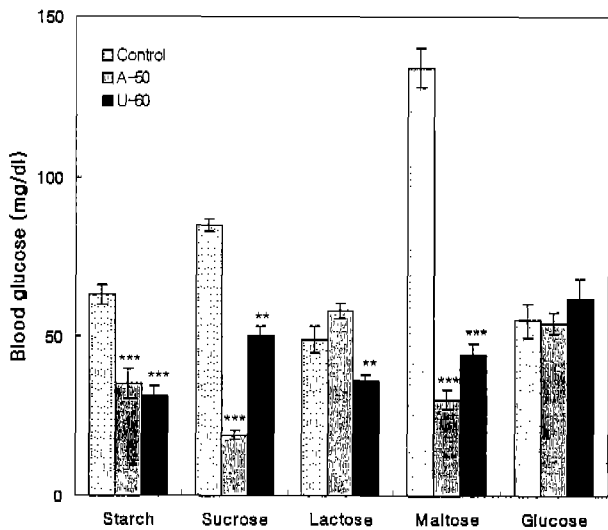


Fig. 2. Effects of Amberlite active fraction and acarbose on blood glucose after an oral carbohydrate (2 g/kg) load in mice. All values are mean \pm SE. **Significantly different from the control value at $p < 0.05$. ***Significantly different from the control value at $p < 0.01$.

acarbose의 경우 maltose와 sucrose에 대해서는 78%의 큰 억제활성을 그리고 starch 분해에 대해서는 40%의 억제활성을 나타내었으나 우유내의 당성분인 lactose(β -1,4 galactoside) 분해에 대해서는 억제활성이 전혀 없었던 반면 잠노 Amberlite 활성분획은 27%의 억제활성을 나타내었다. 이 결과로부터 잠노 Amberlite 활성분획은 α -1,4 결합이나 α -

1,6 결합으로 이루어진 maltose와 starch의 가수분해에 대해서는 강력한 저해활성을 나타낸 반면 α -1,2 결합의 table sugar인 sucrose와 β -1,4 결합의 milk sugar인 lactose 가수분해에 대해서는 상대적으로 적은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다. 사람들이 음식에서 섭취하는 탄수화물의 80% 가량이 starch와 sucrose인 사실과 소장점막내 탄수화물 분해효소인 sucrase-isomaltase(SIM)과 maltase-glucoamyl ase(MGA)의 기질선택성이 중복된다는 사실(Johnson, 1997; Nichols 등, 1998)에 근거하여 잠노 Amberlite 활성분획은 소장내 glycosidase 효소반응에 대한 저해작용으로 인해 식 후 급격한 혈당상승을 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 한편 glucose 부하에 대한 혈당상승에 Amberlite 활성분획과 acarbose 모두 영향이 없는 것으로 보아 포도당 흡수과정에는 아무런 작용을 미치지 않는 것으로 판단된다.

다음으로 maltose 부하후 시간경과에 따른 혈당상승 억제활성을 acarbose와 비교한 실험에서 maltose와 시료를 함께 투여시 투여 후 18분, 35분, 60분에서 유의한 혈당상승 억제효과가 있었으며 시료투여후 90분까지도 유의한 혈당상승 억제활성을 관찰할 수 있었다. 이때 억제활성의 크기는 acarbose 50 mg/kg을 투여하였을 때와 거의 유사하였다 (Fig. 3).

이상의 결과로부터 Amberlite 활성분획은 소장내 α -glycosidase를 선택적으로 억제함으로 당부하시 급격한 혈당상승을 지연시킨다. 한편 잠노의 위장관 공복시간(gastric

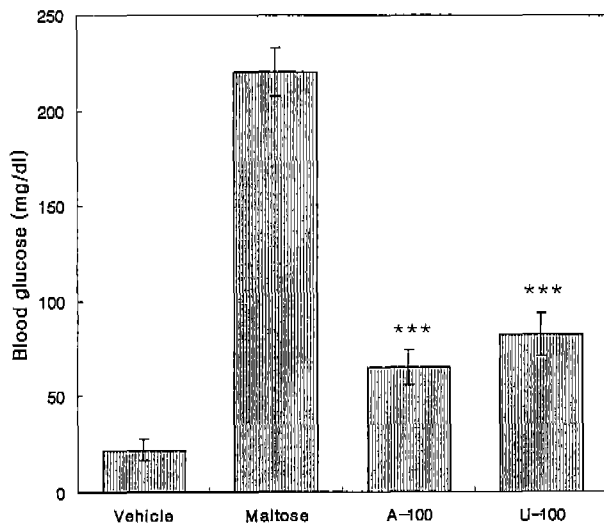


Fig. 4. Effects of Amberlite active fraction and acarbose on blood glucose after an oral maltose (2 g/kg) load in alloxan-induced diabetic mice. All values are mean \pm SE.

***Significantly different from the control value at $p < 0.01$.

emptying time), 장관운동(gastric motility) 혹은 당수송체(장의 basolateral membrane에 위치하는 glucose transporter 2)에 미치는 작용에 대해서는 앞으로 검토해 볼 계획이다.

마지막으로 당뇨동물모델에서 본 시료의 혈당상승 억제 활성의 유무와 크기를 살펴보기 위해 알록산 유도 고혈당 마우스에서 maltose와 함께 Amberlite 활성분획(100 mg/kg)을 투여하였을 때 63%의 혈당상승 억제효과가 있었고 이때 대조약물로 사용한 acarbose는 같은 용량에서 70%의 혈당상승 억제효과를 나타내 두 그룹간에 큰 차이가 없었다 (Fig. 4). 따라서 잠노 Amberlite active fraction은 기존의 당뇨치료제인 acarbose와 같은 용량에서 거의 비슷한 효능의 혈당상승 억제활성을 나타냄을 본 실험 결과 알 수 있었다.

앞으로 잠노의 Amberlite 활성분획으로부터 소장내 α -glycosidase 억제 물질들을 분리하여 향후 당뇨병치료제로 개발할 수 있기를 기대한다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 농촌진흥청 주관 "농업특정연구개발사업" 연구비와 (주) 상아제약 연구비에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 류강선, 정성현 (1998). 누에분말의 혈당강하 효과 pp 69-70 "누에와 당뇨" 도서출판 신일상사, 서울.
- 정성현, 류강선, 홍기원, 이상풍 (1998). 누에분말을 유효성분으로 포함하는 혈당강하제 및 그의 제조방법. 국내특허번호 제151731호(1998년 6월 23일 등록), 일본특허번호 제 2757937호(1998년 3월 13일 등록).
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M. and Yamamoto, M. (1996). Calystegin N1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hypscyamus niger*: Structure determination and glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* **284**, 169-178.
- Asano, N., Oseki, K., Kizu, H. and Matsui, K. (1994). Nitrogen-in-the-Ring Pyranoses and Furanoses: Structural Basis of Inhibition of Mammalian Glycosidases. *J. Med. Chem.* **37**, 3701-3706.
- Chung, S. H., Yu, J. H., Kim, E. J. and Ryu, K. S. (1996). Blood glucose lowering effect of silkworm. *Bull. K. H. Pharma. Sci.* **24**, 95-100.
- Johnson, L. R. (1997). Digestion and absorption in Gastrointestinal physiology, 5th ed. pp 113-120, Mosby-Year Book, St. Louis.
- Marks, V. and Dawson, A. (1965). Rapid stick method for determining blood glucose concentration. *Br. Med. J.* **24**, 293-294.
- Nichols, B. L., Eldering, J., Avery, S., Hahm, D., Quaroni, A. and Sterchi, E. (1998). Human small intestinal maltose-glucosylase cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **273**, 3076-3081.
- Rhinehart, B. L., Robinson, K. M., LiU, P. S., Payne, A. J., Whetley, M. E. and Wagner, S. R. (1987). Inhibition of intestinal disaccharidase and suppression of blood glucose by a new α -glycosidase inhibitor-MDL25,637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**(3), 915-923.