

상엽 에탄올가용분획의 글루코스전달체, acetyl-CoA 카복시라제 및 렙틴 mRNA 발현에 미치는 영향

류정화 · 육창수 · 정성현[#]

경희대학교 약학대학

(Received October 8, 1998)

Effects of Mori Folium Ethanol Soluble Fraction on mRNA Expression of glucose transporters, acetyl-CoA carboxylase and leptin

Jeong Wha Ryu, Chang Soo Yook and Sung Hyun Chung

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

Abstract—Effects of Mori Folium Ethanol Soluble Fraction (MFESF) on mRNA expression of glucose transporters, acetyl-CoA carboxylase (ACC) and leptin were examined in db/db mice. 500 and 1000 mg/kg dose for MFESF (designated by SY 500 and SY 1000, respectively) and 5 mg/kg dose for acarbose were administered for 6 weeks. Quantitations of glucose transporters (GLUT-2 and GLUT-4), ACC and leptin mRNA were performed by RT-PCR and *in vitro* transcription with co-amplification of rat β -actin gene as an internal standard. Muscular GLUT-4 mRNA expression in MFESF-treated groups were increased dose dependently. On the other hand, MFESF caused the GLUT-4 and leptin mRNA expressions in adipose tissue to decrease dose dependently, which means that triglyceride synthesis in adipocytes might be decreased and consequently signals adipocytes to inhibit the synthesis and release of leptin. Hepatic ACC mRNA expression in MFESF-treated groups was also decreased, and this may result in lowering of serum triglyceride level. In contrast, liver GLUT-2 mRNA expressions in MFESF-treated and acarbose groups were increased. Higher rate of glucose uptake into hepatocytes is known to inhibit a phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)-catalyzed reaction, which is a rate-limiting step in gluconeogenesis.

Keywords □ Mori Folium, db/db mouse, GLUT-2, GLUT-4, acetyl-CoA carboxylase, leptin, RT-PCR, *in vitro* transcription.

상엽(뽕나무 잎)은 본초강목 등의 동양의약서에 상백피, 누에고치 등과 함께 消渴症(지금의 당뇨)에 치료효과가 있음이 기록되어 있다. 이주선 등은 상엽수총의 메탄올가용분획이 정상마우스에서 소장내 glycosidase 활성을 억제하여 전분, 맥아당 혹은 서당 부하시 혈당상승에 저해활성이 탁월함을 밝힌바 있고,¹⁾ 최근에는 고탄수화물식이를 장기간 마우스에 투여한 동물모델에서 상엽과 누에분말 추출액이 체중, 혈중 포도당 및 인슐린

량 그리고 소장내 glycosidase의 부위별 활성에 미치는 영향을 보고한 바 있다.²⁾

Le Marchand-Brustel 등은 goldthioglucose로 비만하고 고인슐린혈증을 나타내는 동물모델을 유도한 후 acarbose(glycosidase 저해제로 현재 당뇨병치료제로 사용됨)를 4개월간 투여한 실험에서 근육조직에서 감소된 기초 포도당유입율이 약물처리군에서 정상 수준으로 회복됨을 보고한 바 있다.³⁾ 기초 포도당유입율의 감소는 고혈당과 인슐린저항성을 일으키는데 중요한 역할을 하며 이는 glucose transporter 수의 감소 때문이다.⁴⁾ Glucose transporter의 수는 유전자의

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0373 (팩스) 02-966-3885

mRNA 발현수준에 달려있으므로 Le Marchand-Brustel 실험에서 acarbose는 비만 당뇨동물모델에서 보여지는 glucose transporter mRNA의 감소를 저해하는 활성을 나타낼 가능성을 보여주었다.

또한 Maury 등은 젖먹이 기간의 흰쥐(생후 19일)에 acarbose를 투여하였을 때 지방조직이 줄고 lipogenic enzyme인 fatty acid synthase(FAS)와 acetyl-CoA carboxyl-ase(ACC)의 활성과 mRNA 발현의 감소가 있음을 보고하였다.⁵⁾

장내 α -glycosidase 저해제인 acarbose와 유사한 기전에 의해 항당뇨활성을 나타내는 상엽이 근육과 지방조직 그리고 간조직의 glucose transporters(GLUT-4, GLUT-2) 그리고 지방조직의 leptin, 간조직의 ACC mRNA 발현에 미치는 영향을 보기위해, 본 연구에서는 비만유전자(leptin) 수용체인 Ob-Rb가 mutation되어 leptin의 신호전달과정에 결함이 생겨 제2형 당뇨와 유사한 형태의 비만증, 고인슐린혈증, 고혈당 등을 특징적으로 나타내는 db/db 마우스를 이용하여 상엽 에탄올가용분획을 6주간 장기 투여한 후 각 조직으로부터 해당유전자의 mRNA 발현정도를 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)과 *in vitro* transcription 방법으로 살펴보았다.

실험재료 및 방법

시료 – 농업진흥청 임사곤충연구소에서 제공받은 뽕나무(*Morus bombycina*)잎 분말을 환류냉각기를 장치하여 수육상에서 증류수로 3시간씩 3회 추출한 후 온시여과하고 여액을 모아 rotary evaporator를 사용하여 감압 건조하여 물추출물을 얻었다. 물 추출물 일정량을 증류수에 용해시킨 다음 증류수 부피의 10배에 해당하는 에탄올을 가하여 4°C에서 24시간 섞어준 후 여과하고 여액을 감압 건조후 동결 건조하여 에탄올 가용분획을 얻어 본 실험에 사용하였다. 이때 상엽 분말로부터의 수득율은 6.8% 이었다.

시약 – Tris, MgCl₂, CaCl₂, BSA, spermidine, DTT, DEPC, Triton X-100 등은 Sigma사로부터 구입하였으며, AMV reverse transcriptase, DNase, recombinant RNase inhibitor(rRNasin), random primers, dNTP, rNTP, T7 RNA polymerase 등은 Promega사로부터 구입하였고, RNA extraction kit는 Ambion사로부터 구입하였고 *Taq* DNA polymerase는

Beringer Mennheimn사에서 구입하여 사용하였다. (α -³²P)CTP는 Amersham사에서 구입하였으며 그외 시약은 시판 특급 혹은 일급시약을 사용하였다. PCR sense 및 antisense primer는 바이오니아사(충북 청원, 한국)에 주문하여 사용하였다.

실험기기 – 본 실험에 사용한 기기 및 모델명은 다음과 같다. Electrophoresis system(SE260, Hoefer, USA), Gamma scintillation counter(Wallac 1409, Wallac, Finland), Homogenizer(Mazala A-1100, EYELA, Japan), Microcentrifuge(5417R, Eppendorf, Germany), Photographic system(SL-5, UVP, USA), Refrigerated bath circulator(RC-10V, JEIO TECH Co., Korea), Rotary evaporator(NE-1, EYELA, Japan), Shaking water bath(NTS-2000, EYELA, Japan), Thermal cycler(PTC-200, MJ Research, USA), UV spectrophotometer(U-3210, Hitachi, Japan).

실험동물 – 7주령의 웅성 C57BL/KsJ db/db 마우스(Jackson Laboratory, USA)를 4군으로 나누어 증류수 투여군을 db/db 대조군, 체중 kg당 상엽 에탄올 가용분획 500, 1000 mg 투여군을 각각 SY 500, SY 1000군, acarbose 5 mg/kg 투여군을 acarbose군으로 설정하였고, 정상군으로 7주령의 웅성 C57BL/KsJ +/+ 마우스를 사용하였으며 lean 군으로 명명하였다. 약물 투여기간은 7주령에서 13주령까지의 6주간으로 증류수에 시료를 용해시켜 음용수로 공급하였다.

척추 분리법으로 마우스를 희생시킨 후 total RNA 분리를 위해서 근육, 지방 및 간조직을 절취하여 -70°C 냉동고에 보관한 후 사용하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)과 *in vitro* transcription – Glucose transporters, leptin, ACC mRNA의 정량은 internal standard와 함께 RT-PCR과 *in vitro* transcription 방법에 의해 실시하였다.⁶⁾ 각 조직으로부터 guanidine thiocyanate와 acid phenol extraction을 이용한 Chomczynski 등의 방법으로 RNA를 분리하였다.⁷⁾

분리한 RNA를 DNase(DNase 50 unit, rRNasin 20 unit, 50 mM Tris(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 2.5 μ g BSA, 총 부피 50 μ l)로 37°C에서 60분간 처리하여 genomic DNA를 제거한 후, reverse transcription 반응(AMV reverse transcriptase 10 unit, 1×buffer(50 mM Tris, 10 mM MgCl₂,

0.5 mM KCl, 0.5 mM spermidine, 10 mM DTT), random primers 0.5 µg, 2.5 mM dNTPs, rRNasin 20 unit, 총 부피 50 µl)을 37°C에서 60분간 실시하여 cDNA를 합성하였다.

생성된 cDNA를 주형으로 하여 Taq DNA polymerase 2 unit, 1×buffer(10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100), 200 µM dNTPs, 12 pmole의 sense와 antisense primer(총 부피 50 µl)를 사용하여 GLUT-2, GLUT-4, leptin, ACC cDNA 일부분을 증폭하였다. 이때 PCR 조작 조건은 94°C에서 30초간 denaturation, 57°C(GLUT-2는 60°C)에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 post-incubation하였으며 1% 한천 겜 전기영동을 통해 확인하였다.

GLUT-2 upstream primer로 5'-TAC CAC CAG CAT ACA CAA CAC-3'와 downstream primer 5'-TCT TTG CCC TGA CTT CCT CTT-3'는 mouse liver-type transporter cDNA sequence⁸⁾를 기초로 디자인하였고, GLUT-4 upstream primer로 5'-ACA GAA GGT GAT TGA ACA GAC-3'와 downstream primer 5'-AAC CGT CCA AGA ATG AGT ATC-3'는 muscle/adipose tissue-type transporter cDNA sequence⁹⁾를 기초로 디자인하였으며 이때 생성되는 PCR product의 크기는 각각 561, 285 bp이었다.

Leptin upstream primer로 5'-TTC ACA CAC GCA GTC GGT ATC-3'와 downstream primer 5'-TCA GCA TTC AGG GCT AAC ATC-3'는 mouse leptin cDNA sequence¹⁰⁾를 기초로, PCR product의 크기가 370 bp가 되도록 합성하였다.

ACC upstream primer로 5'-CGG CGG TGG TCT TAT GAA ATG-3'와 downstream primer 5'-CTT CGG TGG TCT TAT GAA ATG-3'는 rat ACC cDNA sequence¹¹⁾를 기초로, PCR product의 크기가 318 bp가 되도록 합성하였다. β-actin upstream primer로 5'-CCC TGT ATG CCT CTG GTC GTA-3'와 downstream primer 5'-CAC GCA CGA TTT CCC TCT CAG-3'는 rat β-actin cDNA sequence를 기초로,¹²⁾ PCR product의 크기가 210 bp가 되도록 디자인하였다.

Sense primer의 5' 말단에는 T7 RNA polymerase promoter(5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3')

와 GGGAGA 전사시작 서열을 붙여서 증폭된 cDNA로부터 RNA가 전사될 수 있도록 하였다.

증폭된 cDNA로부터 *in vitro* transcription 반응(T7 RNA polymerase 10 unit, 1×buffer(40 mM Tris(pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 2 mM spermidine, 10 mM DTT), 0.5 mM rATP, rGTP, rUTP, 12 µM rCTP, rRNasin 10 unit, [α -³²P] CTP, PCR product 3 µl, 총 부피 25 µl)을 37°C에서 60분간 실시하여 *in vitro* transcript를 합성하였다. 이를 4.5% denatured polyacrylamide gel에서 전기 영동하여 분리하였다. 겜을 건조한 후 자가 방사 기록하고 겜 상의 띠를 잘라 방사 계측하였다.

결과 및 고찰

근육조직에서 GLUT-4 mRNA 발현 - 제2형 당뇨환자의 주요 병태생리학적 특징은 말초조직에서 인슐린 저항성으로 주로 근육조직에서 인슐린 반응의 결함으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 근육에서 이러한 인슐린 저항성을 일으키는 요인으로 포도당 수송단체에 의한 포도당 수송의 결함을 들 수 있는데, 이는 인슐린 의존성 조직인 근육조직에서 인슐린 자극에 의한 조직내로의 포도당 수송이 포도당 이용 속도를 결정짓는 율속단계로 생각되기 때문이다.¹³⁾

근육이나 지방조직에서 인슐린 의존성 포도당 수송을 담당하는 것은 hexose carrier중 GLUT-4 형으로, db/db 마우스나 스트렙토조토신 유도 고혈당 흰쥐의 근육조직에서 GLUT-4의 mRNA 및 단백질 함량이 감소함이 보고되었다.¹⁴⁾ 또한 Gibbs 등은 db/db 마우스에 human GLUT-4를 overexpression시킨 마우스에서 혈당이 감소함을 보고하여 GLUT-4의 증가가 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.¹⁵⁾

본 실험에서는 상엽 에탄올가용분획의 투여로 인한 근육조직의 GLUT-4 mRNA 발현의 변화를 측정함으로 말초 인슐린 저항성이 개선 혹은 악화되는지를 살펴보았다. Fig. 1에서 보듯이 db/db 대조군은 lean 군에 비해 GLUT-4 mRNA 양이 56% 감소하였으나(lean 군, 94.1: db/db 대조군, 41.5), 상엽 시료를 투여하였을 때 용량의존적으로 GLUT-4 mRNA 양이 증가하였다(SY 500, 53.6: SY 1000, 118.4). 한편 acarbose의 경우는 GLUT-4 mRNA 발현이 오히려 감소하는 결과를 나타내었다(db/db 대조군, 41.5: acarbose, 21.8).

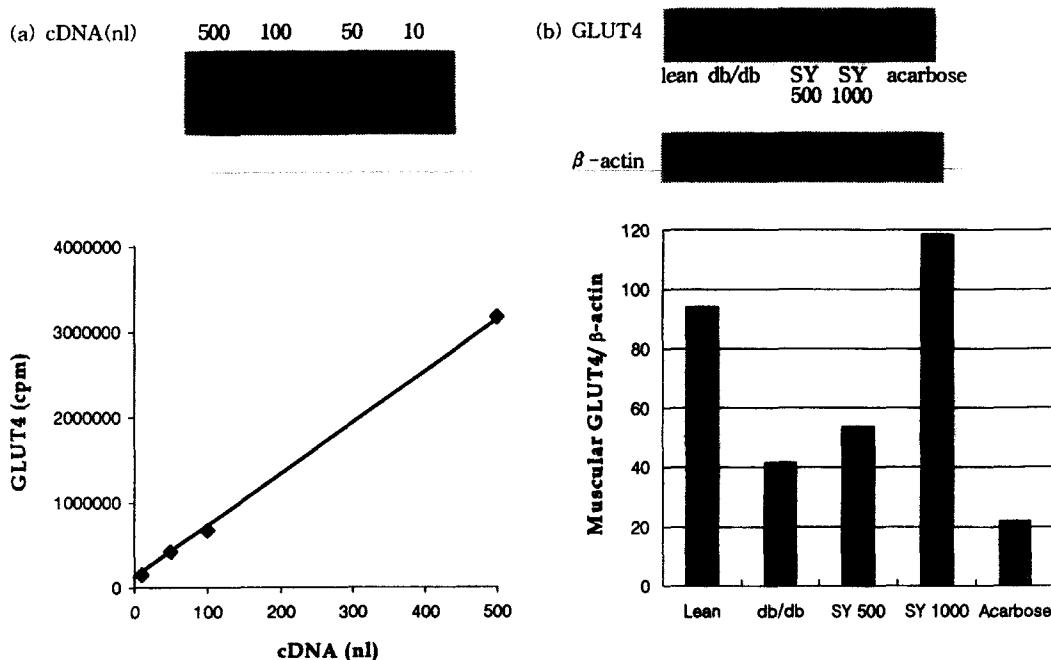


Fig. 1 — Effects of Mori folium ethanol soluble fraction (MFESF) and acarbose on GLUT-4 mRNA expression in quadriceps muscle.

(a) Calibration curve of GLUT-4 cDNA PCR products; (b) Effects of MFESF and acarbose on GLUT-4 and β -actin mRNA expressions. At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the muscle was removed and total RNA was extracted, then specific mRNA was analysed by RT-PCR and *in vitro* transcription. GLUT-4 mRNA was expressed as an arbitrary unit which is relative to internal standard, β -actin.

이 결과로부터 상엽 에탄올가용분획의 투여는 GLUT-4의 감소로 인해 인슐린 저항성이 발생된 db/db 당뇨동물모델에서 GLUT-4의 발현을 회복시킴으로서 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 상엽이 GLUT-4 mRNA 발현에 직접적으로 영향을 미치는지 아니면 고혈당의 조절등으로 인한 간접적인 결과인자에 대한 연구를 해 나갈 계획이다.

지방조직에서 leptin과 GLUT-4 mRNA 발현 – db/db 마우스는 leptin 수용체(Ob-R) 유전자의 G → T 점 돌연변이로 인해 splice donor 부위가 생긴 결과, 맥락 총에 위치한 Ob-Ra형 leptin 수용체의 C-말단 exon 106 염기쌍이 시상하부에 위치한 Ob-Rb형 leptin 수용체에 삽입된 형태의 변형된 수용체를 가지고 있다. 이렇게 mutation된 Ob-Rb 수용체는 시상하부에서 leptin과 정상적인 결합은 하나 세포내로 leptin의 신호전달과정에 문제가 있다.¹⁶⁾ 그 결과 혈액을 통해 순환하는 렙틴은 시상하부내 궁상핵(arcuate nucleus)에서 neuropeptide Y(NPY)의 생성과 유리를 억제시키지 못함으로 식이섭취의 억제기능이 소실되어 결과 비만, 고혈당,

고인슐린혈증 등의 증상이 나타나며, 지방조직의 증가로 인해 leptin mRNA 발현과 혈중 leptin치가 20 배 이상 증가한다.¹⁷⁾ 또한 db/db 마우스에 직접 렙틴을 복강주사하여도 식이량이나 혈당, 체중 등의 감소를 일으키지 않는다. Leptin mRNA의 발현과 합성은 지방조직에서만 일어나며 지방조직의 부피에 비례하므로 leptin의 발현정도는 지방조직 함량의 변화를 측정하는 지표로 이용된다.

본 실험에서는 지방조직에서 상엽 에탄올가용분획의 leptin mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 2에서 db/db 대조군은 lean 군에 비해 leptin mRNA 발현이 현저하게 증가된 반면(lean 군, 0.2; db/db 대조군, 20.9), 상엽 에탄올가용분획을 투여하였을 때는 용량의존적으로 leptin 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다(SY 500, 3.56; SY 1000, 1.4). 한편 acarbose의 경우는 투여용량에서 오히려 증가하는 경향을 나타내었다(db/db 대조군, 20.9; acarbose, 31.32). 이러한 결과는 시료투여군에서 지방조직의 함량이 현저히 감소하였음을 시사하며, db/db 마우스에 상엽 에탄올가용분획을

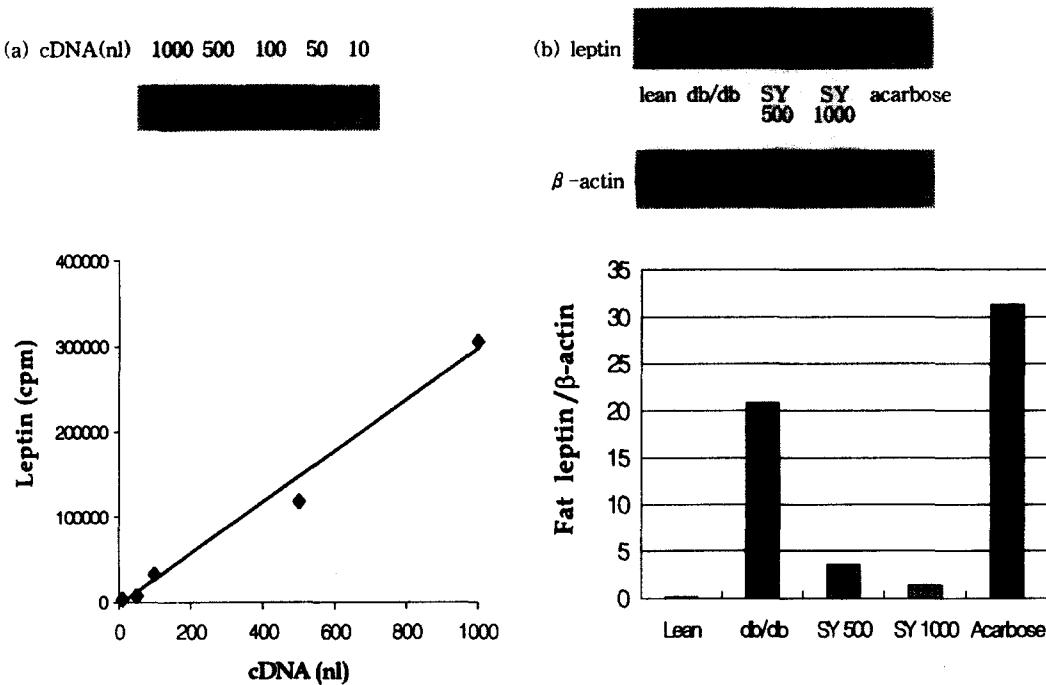


Fig. 2 — Effects of Mori folium ethanol soluble fraction(MFESF) and acarbose on leptin mRNA expression in white adipose tissue.

(a) Calibration curve of leptin cDNA PCR products; (b) Effects of MFESF and acarbose on leptin and β -actin mRNA expressions. At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the white adipose tissue was removed and total RNA was extracted, then specific mRNA was analysed by RT-PCR and *in vitro* transcription. Leptin mRNA was expressed as an arbitrary unit which is relative to internal standard, β -actin.

6주간 투여하였을 때 용량의존적으로 체중과 중성지방이 감소되는 결과와 일치한다.¹⁸⁾

근육으로 수송된 포도당이 글라이코겐의 형태로 에너지원으로 저장되는 것과 달리 지방조직으로 수송된 포도당은 지방산 합성에 소량 이용되고 대부분은 중성지방의 합성에 필요한 glycerol 3-phosphate로 전환된다. 본 실험에서는 여분의 혈중 포도당이 지방세포 표면의 GLUT-4를 이용하여 세포내로 들어가 중성지방으로 전환되는데 미치는 상엽의 영향을 살펴보고자, 지방조직의 GLUT-4 mRNA 발현을 측정해 보았다.

Fig. 3에서 db/db 대조군은 lean 군에 비해 GLUT-4 mRNA 발현이 20배 가까이 증가되었다(lean 군, 5.31; db/db 대조군, 105.2). 이것은 lean 마우스에 비해 db/db 마우스에서 과도하게 지방조직이 축적된 것과 일치한다. db/db 마우스에 상엽 에탄올가용분획을 투여하였을 때는 용량의존적으로 GLUT-4 mRNA 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다(SY 500, 6.8; SY 1000, 2.7). 한편 acarbose의 경우는 db/db 대조군과

거의 비슷한 정도의 GLUT-4 mRNA 발현을 나타내었다(db/db 대조군, 105.2; acarbose, 94.6). 이 결과는 시료투여군에서 지방조직으로 포도당 수송이 감소함을 의미하며 그 결과 글리세롤의 합성이 줄어들어 중국에는 지방조직에서 에너지 저장형태인 triglyceride 또한 감소한 것으로 생각된다. 이는 Fig. 2에서 지방조직의 합량 감소와 이로 인한 leptin mRNA의 발현 감소 현상을 뒷받침해 주는 결과이다.

간조직에서 ACC와 GLUT-2 mRNA 발현 — 지방산 합성에 관련된 대표적인 효소로 acetyl-CoA carboxylase(ACC)와 fatty acid synthase(FAS)가 있다. ACC는 지금까지 클로닝된 효소 중 가장 큰 효소로서 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 탄산화시킨다. Malonyl-CoA는 지방산 합성 뿐만 아니라 polypeptides 등 여러가지 물질의 합성에 관련되어 있으며 특히 간사슬 지방산의 미토콘드리아 산화반응에 필요한 palmitoyl-CoA carnitine shuttle system의 조절인자이다.

본 실험에서는 포도당이 지방산으로 전환되는 lipo-

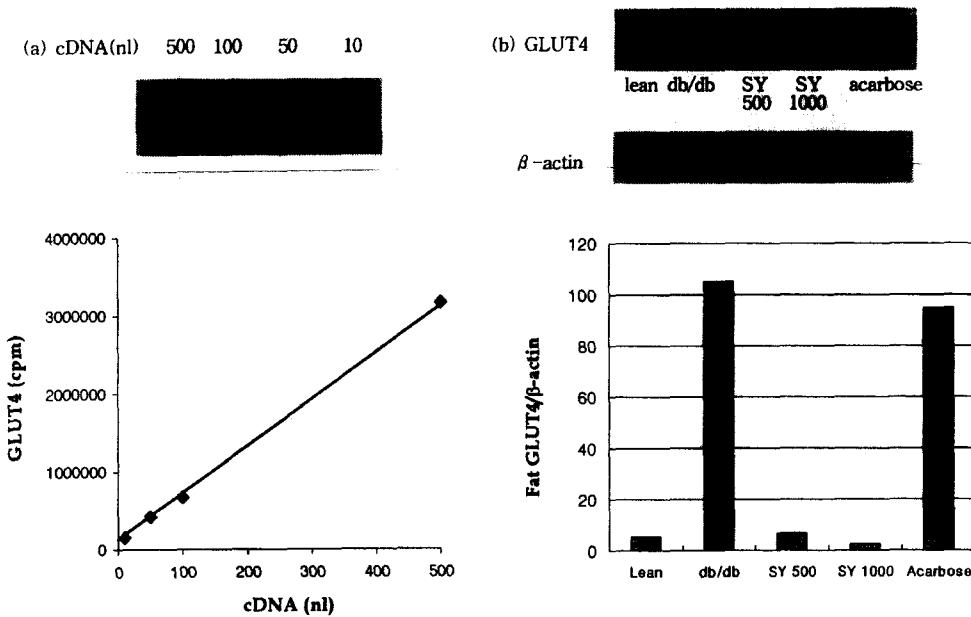


Fig. 3—Effects of Mori folium ethanol soluble fraction(MFESF) and acarbose on GLUT-4 mRNA expression in white adipose tissue.

(a) Calibration curve of GLUT-4 cDNA PCR products: (b) Effects of MFESF and acarbose on GLUT-4 and β -actin mRNA expressions. At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the white adipose tissue was removed and total RNA was extracted, then specific mRNA was analysed by RT-PCR and *in vitro* transcription. GLUT-4 mRNA was expressed as an arbitrary unit which is relative to internal standard, β -actin.

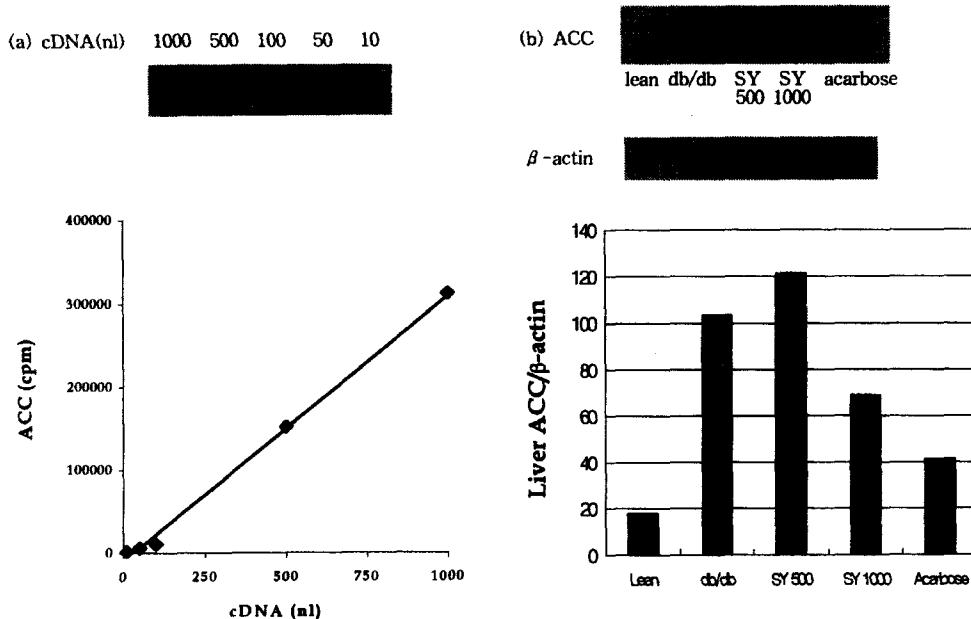


Fig. 4—Effects of Mori folium ethanol soluble fraction(MFESF) and acarbose on acetyl-CoA carboxylase(ACC) mRNA expression in liver tissue.

(a) Calibration curve of ACC cDNA PCR products: (b) Effects of MFESF and acarbose on ACC and β -actin mRNA expressions. At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the liver tissue was removed and total RNA was extracted, then specific mRNA was analysed by RT-PCR and *in vitro* transcription. Acetyl CoA carboxylase mRNA was expressed as an arbitrary unit which is relative to internal standard, β -actin.

genic capacity에 미치는 영향을 살펴보자. 상엽 에탄올가용분획이 간조직에서 지방상 합성에 관여하는 효소인 ACC mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 4에서 db/db 대조군은 lean 군에 비해 ACC mRNA 발현이 5배 가까이 증가되었다(lean 군, 17.9; db/db 대조군, 103.6). 이것은 정상인에 비해 제2형 당뇨환자에서 혈중 중성지방의 함량이 3~4배 많은 것과 일치한다. 한편 db/db 마우스에 상엽 에탄올가용분획을 투여하였을 때 시료 500 mg/kg을 투여하였을 경우 db/db 대조군보다 약간 상승된 ACC mRNA 발현을 나타내었으나, 1000 mg/kg을 투여하였을 때는 ACC mRNA 발현이 약 30% 감소되었다(SY 500, 121.4; SY 1000, 69.0). 한편 acarbose의 경우는 db/db 대조군에 비해 ACC mRNA 발현이 60% 가까이 감소되었다(db/db 대조군, 103.6; acarbose, 41.4). ACC mRNA의 감소가 ACC 활성의 감소를 초래한다고 할 때 이는 유리지방산의 합성이 감소함을 의미하며, db/db 마우스에 상엽 에탄올가용분획을 6주간 투여하였을 때 용량의존적으로 혈액 중 중성지방의 농도가 감소되는 결과와 일치한다.¹⁸⁾ 특히

acarbose 군에서 ACC mRNA 발현량이 현저히 감소하였는데, Maury 등이 수유기의 흰쥐에 acarbose를 투여한 실험에서 혈중 포도당 농도 및 인슐린 농도의 감소와 함께 ACC, FAS mRNA 및 활성이 감소하였다고 보고한 결과와도 일치한다.¹⁹⁾

근육조직의 glucose transporter(GLUT-4)는 인슐린의 영향 하에 혈중 포도당을 근육세포내로 유입시키는 역할(unidirectional transport)을 수행하는 반면 간조직의 glucose transporter(GLUT-2)는 인슐린과 상관없이 혈중 포도당을 조직내로 유입시키는 동시에 간에서 만들어진 포도당을 세포밖으로 내보내는 bidirectional transporter이다. 본 실험에서는 상엽 에탄올가용분획이 간조직의 GLUT-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보았다.

Fig. 5에서 보듯이 db/db 대조군은 lean 군에 비해 GLUT-2 mRNA 발현이 2.5 배 이상 증가하였으며 시료 투여군에서는 용량의존적이지는 않았지만 db/db 대조군보다 증가하였다(lean 군, 25.5; db/db 대조군, 64.4; SY 500, 102.5; SY 1000, 82.7; acar-

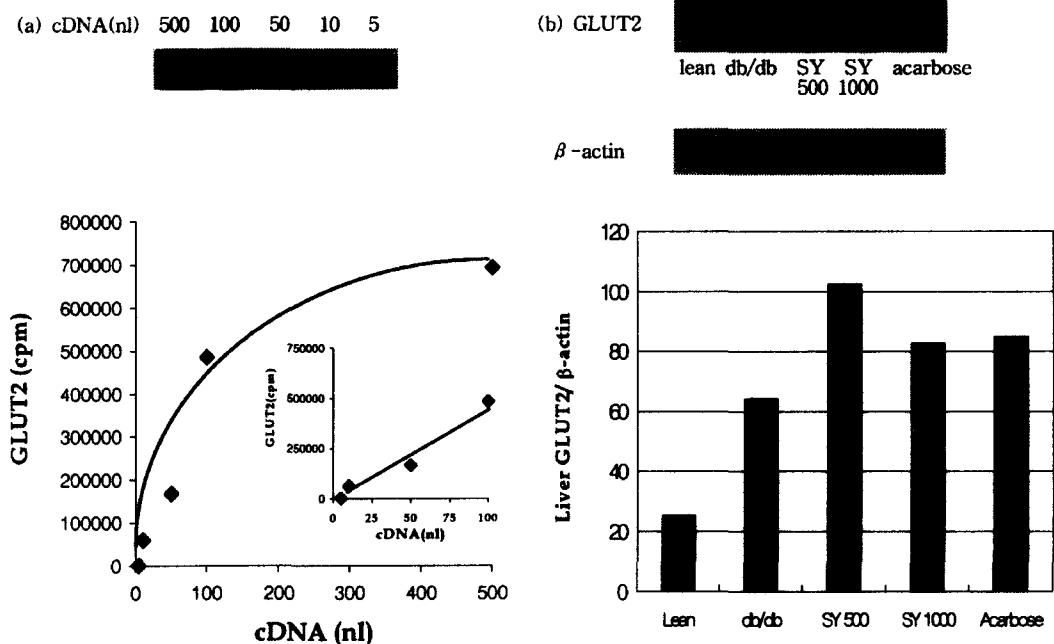


Fig. 5 — Effects of Mori folium ethanol soluble fraction(MFESF) and acarbose on GLUT-2 mRNA expression in liver tissue.

(a) Calibration curve of GLUT-2 cDNA PCR products; (b) Effects of MFESF and acarbose on GLUT-2 and β -actin mRNA expressions. At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the liver tissue was removed and total RNA was extracted, then specific mRNA was analysed by RT-PCR and *in vitro* transcription. GLUT-2 mRNA was expressed as an arbitrary unit which is relative to internal standard, β -actin.

bose, 84.8). 간조직내 당신생 과정에서 융속단계 효소인 phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEP-CK)는 인슐린과 포도당에 의해서는 활성이 억제되고 반면 glycogenic amino acids에 의해서는 효소반응이 촉진된다.²⁰⁾ 본 실험 결과 상엽 에탄올가용분획은 GLUT-2의 mRNA 발현을 증가시켜 간조직내로 포도당수송을 증가시킨 결과 당신생과정을 억제시키는 활성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 결과는 상엽 에탄올가용분획을 db/db 마우스에 6주간 투여하였을 때 공복시 혈당이 유의적으로 감소된 결과와 일치한다.¹⁸⁾

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 경희대학교부설 “경희동서약학 연구소” 지원연구비에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Lee, J. S., Choi, M. H. and Chung, S. H. : Blood glucose lowering effects of Mori Folium. *Yakhak Hoeji* **39**(4), 367 (1995).
- 2) Kim, M. S., Choue, R. W., Chung, S. H. and Koo, S. J. : Blood glucose lowering effects of mulberry leaves and silkworm extracts on mice fed with high-carbohydrate diet. *Korean J Nutrition* **31**(2), 117 (1998).
- 3) Le Marchand-Brustel, Y., Rochet, N., Gremiaux, T., Marot, I. and Van Obberghen, E. : Effect of an α -glycosidase inhibitor on experimentally-induced obesity in mice. *Diabetologia* **33**, 24 (1990).
- 4) Zaninetti, D., Greco-Perotto, R., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Jeanrenaud, B. : Dysregulation of glucose transport and transporters in perfused hearts of genetically obese (fa/fa) rats. *Diabetologia* **32**, 56 (1989).
- 5) Maury, J., Issad, T., Perdereau, D., Gouhot, B., Ferre, P. and Girard, J. : Effect of acarbose on glucose homeostasis, lipogenesis and lipogenic enzyme gene expression in adipose tissue of weaned rats. *Diabetologia* **36**, 503 (1993).
- 6) Horikoshi, T., Daneberg, K. D., Stadlbauer, T. H.

- W., Volkenandt, M., Shea, L. C. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P. and Daneberg, P. V. : Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* **52**, 108 (1992).
- 7) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156 (1987).
- 8) Asano, T., Shibasaki, K., Lin, J. L., Akanuma, Y., Takaku, F. and Oka, Y. : The nucleotides sequence of cDNA for a mouse liver-type glucose transporter protein. *Nucleic Acids Res* **17**(15), 6386 (1989).
- 9) Muekler, M., Caruso, C., Baldwin, S., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W., Lienhard, G. E., Lodish, H. F. : Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter. *Science* **229**, 941 (1985).
- 10) Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425 (1994).
- 11) Lopez-Casillas, F., Bai, D. H., Luo, X. H., Kong, I. S., Hermodson, M. A. and Kim, K. H. : Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5784 (1988).
- 12) Nudel, U., Zakut, R., Shan, M., Neuman, S., Levy, Z. and Yaffe, D. : The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic acids Res* **11**, 1759 (1983).
- 13) Zeil, F. H. and Venkatesa, M. B. : Davidson. Glucose transport is rate-limiting for skeletal muscle glucose metabolism in normal and STZ-induced diabetes rats. *Diabetes* **37**, 885 (1988).
- 14) Garvey, W. T., Huecksteadt, T. P. and Birnbaum, M. J. : Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science* **245**, 60 (1989).
- 15) Gibbs, E. M., Stock, J. L. and McCord, S. C. : Glycemic Improvement in Diabetic db/db Mice by Overexpression of the Human Insulin-re-

- gulatable Glucose Transporter(GLUT-4). *J Clin Invest* **95**, 1512 (1995).
- 16) Lee, G., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. H., Lee, J. I. and Friedman, J. M. : Abnormal splicing of leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**, 6320 (1996).
- 17) Chen, H., Charlalat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, Y., Ellis, S. J., Lakey, N. P., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. F., Duky, G. M., Tepper R. and Morgenster, J. P. : Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **84**, 491 (1996).
- 18) Ryu, J. W., Seo, S. H. and Chung, S. H. : Antidiabetic activity of Mori folium ethanol soluble fraction in db/db mice. *Yakhak Hoeji* **42**(6), 613 (1998).
- 19) Maury, J., Issad, T., Perdereau, D., Gouhot, J. Maury, T. Issad, D., Perdereau, B., Gouhot, Ferre, P. and Girad, J. : Effect of acarbose on glucose homeostasis, lipogenesis and lipogenic enzyme gene expression in adipose tissue of weaner rats. *Diabetologia* **36**, 503 (1993).
- 20) Holzman, I. R. and Milley, J. R. : Neonatal hypoglycemia and the importance of gluconeogenesis. In Clinical studies in medical biochemistry, 2nd ed., pp. 100, Oxford University Press, New York (1997).