

## Streptozotocin 당뇨유발 쥐와 db/db 마우스에서의 피브로인 가수분해물에 의한 인슐린 분비 촉진

박금주 · 홍성의 · 도명술<sup>1</sup> · 현창기<sup>1,\*</sup>

한동대학교 대학원 생명공학과, <sup>1</sup>생물식품공학부

## Stimulation of Insulin Secretion by Silk Fibroin Hydrolysate in Streptozotocin-induced Diabetic Rats and db/db Mice

Kum-Ju Park, Seong-Eui Hong, Myoung-Sool Do<sup>1</sup> and Chang-Kee Hyun<sup>1,\*</sup>

Department of Biotechnology, Graduate School, Handong University, Pohang, Kyungbuk 791-708, Korea, and

<sup>1</sup>School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Pohang, Kyungbuk 791-708, Korea

**Abstract** – Antidiabetic effects of the acid hydrolysate of silk fibroin were investigated by oral administration to animal models for diabetes mellitus. Fibroin protein was extracted from cocoon and digested to peptides of low-molecular weight range (mainly below 3,000) and amino acids by acid hydrolysis. Feeding of the fibroin hydrolysate resulted in a significant recovering effect on reduction of body weight gain and a lowering effect on blood glucose gain in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats (STZ rats) which were used as an insulin-dependent diabetic animal model. But the body weight and blood glucose level in C57BL/KsJ-db/db mice (db/db mice), a non-insulin-dependent diabetic animal model, were not changed significantly by the feeding. On the other hand, plasma leptin levels increased according to increased feeding amount of the hydrolysate in STZ rats and db/db mice in common. It was concluded from the results that the fibroin hydrolysate might stimulate the insulin secretion by recovering or activating pancreatic  $\beta$  cells and result in the increased plasma leptin level. It was also deduced that the antidiabetic improvements in body weight and blood glucose gain in STZ were thought to be due to the increased insulin secretion, but in db/db mice of which the diabetic symptoms were caused by insulin resistance, the stimulated secretion of insulin was unlikely to be able to change body weight and blood glucose level significantly.

**Key words** – Silk fibroin hydrolysate, Streptozotocin-induced diabetic rat, db/db mouse, Insulin secretion, Leptin

당뇨병은 발생기전에 따라 췌장 베타세포를 파괴하는 자가면역과정이 주 원인이 되어 인슐린 분비 부족현상이 발생하는 인슐린 의존형 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus)과 인슐린 저항성, 베타세포 기능저하, 유전적 소인 등의 상호작용으로 인한 인슐린 비의존형 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus)으로 분류된다. 현재 당뇨병의 치료를 위하여 사용되고 있는 경구 혈당강하제에는 탄수화물의 소화를 제한하여 식후 고혈당을 예방하는 ( $\alpha$ -glucosidase 저해제(acarbose, miglitol 등), 인슐린 분비를 촉진하는 약제(sulfonylurea계), 인슐린 감수성을 촉진시키며 hepatic glucose output을 감소시키는 약제(metformin 및 thiazolidinedione계) 등이 있다.<sup>1,2)</sup> 한편 펩타이드 성분의 당뇨치료제인

glucagon-like peptide 1(GLP-1)은 생체 내에서 생합성되는 자연적인 펩타이드로서 췌장 베타세포의 인슐린 분비촉진 및 식이섭취 억제 등의 활성이 있으며, 투여에 의한 항당뇨 효과는 뚜렷하나 체내에서 분해되는 문제로 인해 약효 지속성이 떨어지는 문제가 있어 현재 그 유사 펩타이드들에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>3,4)</sup> 그러나 이들 혈당강하제가 안고 있는 문제점은 젖산 축적의 위험성, 신부전 증상의 악화, 간독성, haemodilution, 체중 증가 등으로 나타나는 여러가지 형태의 부작용이다.<sup>1)</sup> 당뇨병은 혈당강하제의 장기적인 복용이 필요한 만큼 부작용이 적은 혈당강하 활성소재를 개발하여 장기 복용에 대한 안전성을 확보하는 것이 매우 중요하다. 최근 일본에서는 현대의학을 보완하는 대체의료(代替醫療)의 개념이 정착되고 자연치유력 향상 등의 효과를 위해 부작용이 없는 의약대체식품들이 주목받고 있다.<sup>5)</sup>

\*교신저자(E-mail) : ckhyun@handong.edu

이와 같은 추세 속에서 항당뇨 의약대체식품으로서 *Gymnema sylvestre*(김네마), *Lagerstroemia speciosa*(바나바), 뽕나무(*Morus alba*) 등 천연자원을 이용한 상품들이 이미 판매되고 있다. 우리나라에서도 지골피, 방풍, 산약, 지황, 지모, 창출, 현삼, 황백, 맥문동, 닭의장풀, 상엽 등을 비롯한 여러가지 천연 약용식물들이 한방치료 또는 민간요법에서 소갈증에 효능이 있다고 알려지거나 항당뇨 효과를 위해 사용되어 왔으며 최근 들어 이들의 혈당강하효과에 대한 과학적인 규명연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>6-17)</sup> 이 외에도 흔히 차로 음용되는 인삼, 둥글레, 결명자, 구기자 등과 여러 약리작용이 기대되는 메밀, 달맞이꽃 종자유 등 혈당강하효과가 기대되는 천연자원은 매우 다양하며<sup>18-23)</sup> 누에 및 그 관련물질 역시 항당뇨 효과가 이미 보고되어 있다. 이중 누에(*Bombyx mori*)로부터 생산되는 실크는 섬유상 단백질인 피브로인(fibroin)과 이들을 부착시키는 고무상 단백질 세리신(sericin)으로 구성되어 있는데 그 중 피브로인에 대한 여러 생리활성이 밝혀져 왔다. 실크 피브로인을 투여한 쥐에서 혈중 콜레스테롤치와 혈당치가 낮아지고 알코올 흡수가 저해되는 효과가 밝혀졌으며,<sup>24,25)</sup> sulfate기로 반응시킨 피브로인의 경우에는 anti-HIV 활성을 나타내기도 하였다.<sup>26)</sup> 한편 실크 피브로인의 산 또는 효소적 가수분해를 통해 얻어지는 가수분해물은 기능성 식품, 화장품, 의약품 등에 응용되고 있다.<sup>27-30)</sup> 또한 이들 가수분해물들에 대해서도 제2형 당뇨병에 대한 혈당강하효과와<sup>31)</sup> 알코올 흡수저해효과<sup>29)</sup> 등 생리활성 규명 연구가 보고된 바 있다. 그러나 이들 활성연구는 대부분 실험동물에 대한 투여실험의 결과로 나타나는 현상을 보고하고 있으며 그 활성 기전에 대한 연구들이 미흡한 실정에 있다. 특히 국내 및 일본에서 발표된 피브로인의 항당뇨 작용과 관련된 연구결과들을 비교할 때 인슐린 분비 촉진 등의 작용에 대한 해석이 서로 일치하지 않음을 알 수 있다.<sup>24,31,32)</sup> 인슐린의 분비는 인슐린 작용이 복잡한 만큼 다양한 요인에 의해 영향을 받으며, 특히 비만, 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병에 관계하는 leptin 호르몬과 상호 밀접한 영향을 미치고 있음이 밝혀져 왔다.<sup>33)</sup> Leptin은 영양상태에 비례하여 지방세포의 obese gene에서 생성 분비되는 호르몬으로 뇌의 시상하부에 있는 포만중추(satiety center)를 자극하는 식욕조절인자(satiety factor)이다. Leptin은 발열반응과 활동량을 증가시키고 섭취량을 감소시켜 결과적으로 체중과 체지방량을 감소시킨다. 혈청의 leptin 수준은 체중, BMI(body mass index), 체지방량의 증가와 감소에 의해 영향을 받으며 혈청 내 인슐린 농도에 대하여 비례적으로 증가하므로 인슐린에 의해 그 분비가 촉진되는 것으로 알려져 있다.<sup>34,35)</sup>

따라서 본 연구에서는 피브로인의 항당뇨 효과에 대한 보

다 확실한 규명을 위하여, 피브로인의 산 가수분해물을 실험동물에 일정 기간 투여하고 혈당 및 leptin의 농도를 측정함으로써 제1형 및 제2형 당뇨병 모델동물에서의 혈당강하 효과와 더불어 leptin 호르몬의 분비에 미치는 영향을 비교하였다.

## 재료 및 방법

**누에고치의 정련 및 피브로인의 용해** - 정선된 누에고치를 (주)아미노젠으로부터 공급받아 실크 피브로인의 원료로 사용하였다. 우선 누에고치 10 g에 5%(w/v) 농도의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 수용액 500 ml을 처리하여 1시간 동안 가열하고 여과지로 여과하여 용해된 sericin을 제거하였다. 잔사를 열수를 이용하여 수차례 세척함으로써 잔여 sericin과 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 제거하였다. 이로써 sericin이 제거되어 피브로인만 남아있는 피브로인 견사를 얻었다. 이 피브로인 견사를 산 가수분해물 제조에 직접 이용하였다. 피브로인 산 가수분해물 제조를 위해 CaCl<sub>2</sub>에 의한 피브로인 용해를 실시하였다. 피브로인 견사 35 g에 CaCl<sub>2</sub> 226.4 g, 증류수 346 g, ethanol 280 ml을 혼합하고 90°C로 1시간 동안 가열하는 방법으로 CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-Ethanol 3성분 용액을 사용하여 용해시켰다.<sup>36)</sup> 용해된 피브로인 용액은 투석막에 넣어 증류수에 3일간 투석한 후 동결건조하여 분말상태의 피브로인을 얻어 실험에 사용하였다.

**피브로인의 산 가수분해** - 피브로인 견사에 2N HCl 용액을 견사 중량의 80배 용량으로 첨가하여 100°C에서 4시간 동안 가열하면서 피브로인을 가수분해하였다. 제조된 가수분해물은 진한 암갈색을 나타내었고, 여기에 2N NaOH를 첨가하며 중화시켜 pH 7.4가 되도록 하였다. 중화된 가수분해물에는 활성탄을 전체 용액 용량의 6%가 되도록 첨가하여, 60분 동안 교반함으로써 각종 비용해 물질 및 이취등을 제거한 후 여과하여 투명한 액상의 가수분해물을 얻었다. 이 가수분해물 용액을 투석막을 사용하여 증류수로 1일 동안 투석하여 염을 제거하였다. 염이 제거된 가수분해물 용액을 동결건조하여 분말로 얻고 실험에 이용하였다.

**산 가수분해물의 gel filtration chromatography** - 산 가수분해된 피브로인 시료를 10 mg/ml의 농도가 되도록 증류수에 용해시킨 후 Sephadex G-25 gel chromatography column(2 × 60 cm)에 2 ml loading하여 3차 증류수로 elution시켜 펩타이드의 크기에 따른 분획을 분리하였다. 각 분획의 크기는 약 3 mL로 하고 각 분획의 214 nm에서의 UV 흡광도를 측정하여 chromatogram을 얻었다.

**실험동물 및 실험설계** - 1) 인슐린 의존형 당뇨병 모델 동물 : 6-7주령(300-350 g)의 수컷 Sprague-Dawley(SD) rat을 한국생명공학연구소(대전, 한국)에서 분양받아 실험에 사

용하였다. 실험동물들을 밀망이 설치된 rat cage에 각각 넣고  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도와  $50 \pm 5\%$ 의 습도에서 12시간 간격으로 light-dark cycle을 주면서 사육하였다. 당뇨를 유발시키기 전 1주일간 적응시킨 후 인슐린 의존형 당뇨병을 유도하기 위하여 streptozotocin(STZ, Sigma, St. Louis, MO)을 실험동물에 복강주사하였다. 이를 위하여 STZ를 0.5M citrate buffer(pH 4.5)에 녹여 얼음수조에서 차갑게 유지하고 65 mg/kg body weight가 되도록 주사하되 총 주사량이 0.5 ml 이 넘지 않도록 하였다. 1차 주사 24시간후 2차 주사를 실시하고 6일 후 혈당치 측정을 통해 당뇨유발을 확인하였으며 혈당량이 200 mg/dl 이상의 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다. 실험군은 총 4개의 군으로 나누었다. 당뇨가 유발된 개체들은 산 가수분해물 시료를 식이량의 1%(w/w) 및 3%(w/w)에 해당하는 양을 증류수에 녹여 투여하는 1% 투여군과 3% 투여군, 증류수만을 공급하는 당뇨대조군으로 나누었으며, 정상대조군으로 사용한 SD rat에는 동일 부피의 citrate buffer만을 2차례 주사하여 사용하였다. 시료의 투여 실험은 4주간 실시하였다.

2) 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물 : 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물은 한국생명공학연구소로부터 8주령된 수컷 C57BL/KsJ db/db 마우스(db/db)를 분양받아 사용하였고, 정상대조군으로서는 8주령의 수컷 C57BL/KsJ +/+ 마우스를 사용하였다. 실험동물들은 밀망이 설치된 mouse cage에 각각 넣고  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도,  $50 \pm 5\%$ 의 습도, 12시간 간격의 light-dark cycle 환경 하에서 사육하였다. 시료투여 전 1주일간 적응시킨 후 산 가수분해물 시료를 증류수에 용해시켜 투여하면서 8주간의 투여실험을 실시하였다. 실험군은 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물에서의 동일하게 정상대조군(lean control), 당뇨대조군, 1% 투여군, 3% 투여군 등 4군으로 나누었다.

**혈액시료 채취와 체중 및 혈당치의 측정** - 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물의 경우에는 3일에 1회 일정한 시간에 체중과 혈당량을 측정하였다. 혈당량 측정을 위해 절식 3시간 후 혈액을 꼬리정맥으로부터 채혈하였고 채혈 즉시 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액인 혈장을 얻어 혈당치 측정에 이용하였다. 투여실험을 종결하는 사육 4주째에는 절식 3시간 후 척추분리법을 통해 실험동물을 희생시키고 복강동맥으로부터 다량의 혈액을 취하여 혈중 leptin 측정 등을 위한 혈액시료를 확보하였다. 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물인 db/db 마우스의 경우에는 1주에 1회 일정한 시간에 체중을 측정하고, 2주에 1회 혈당치 측정을 위해 절식 3시간 후 마취없이 안와정맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액인 혈장을 얻었다. 투여실험을 종결하는 사육 8주째에는 인슐

린 의존형 당뇨병 모델동물과 동일한 방법으로 혈중 leptin 측정 등을 위한 다량의 혈액시료를 확보하였다. 혈당치는 glucose oxidase의 반응을 이용한 혈당 측정용 diagnostic kit(Sigma)를 사용하여 측정하였다. 즉 혈장 10  $\mu\text{l}$ 에 Trinder 시약 3 ml를 첨가하고 상온에서 18분간 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였으며 포도당 표준곡선을 이용해 혈중 포도당 농도를 산출하였다.

**혈중 leptin 농도의 측정** - 인슐린 의존형 및 비의존형 당뇨병 모델동물로부터 얻어진 혈액시료에 대한 혈중 leptin 농도는 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 혈청시료 100  $\mu\text{l}$ 를 rabbit anti-murine leptin IgG(2.5  $\mu\text{g/ml}$ )로 1시간 동안 pre-coating 한 Maxicorp immunoplate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 incubation하였다. 이어서 TBS (0.05%의 Tween 20을 포함하는 PBS)로 3차례 세척한 후 second antibody(biotinylated anti-rabbit IgG, 250 ng/ml) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 incubation하였다. 동일한 방법으로 3차례 세척한 후 streptavidin-horse radish peroxidase(1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN)를 넣고 재차  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 incubation하였다. Immunoreactivity는 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 의 tetramethylbenzidine dihydrochloride substrate(Amresco, Solon, Ohio)를 넣고 30분간 반응시키고 well 당 50  $\mu\text{l}$ 의 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**피브로인 산 가수분해물의 gel filtration chromatography** - 실크 피브로인에 대하여 Sephadex G-25 gel filtration chromatography를 실시한 결과 Fig. 1과 같이 펩타이드 분획들이 분리되었다. 본 실험조건에서의 Sephadex G-25의 분리특성은 Hyun 등의 보고<sup>37)</sup>에서의 동일한 방법으로 조사한 결과, 분자량 10,000-3,000 사이, 3,000-1,000 사이,

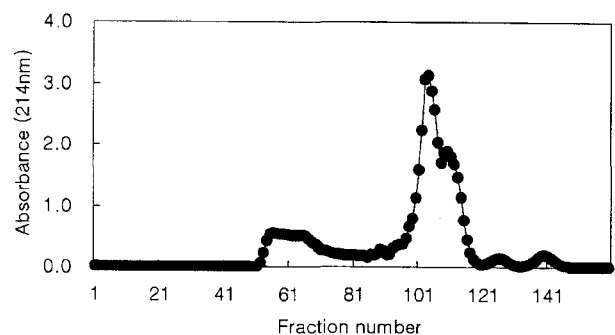
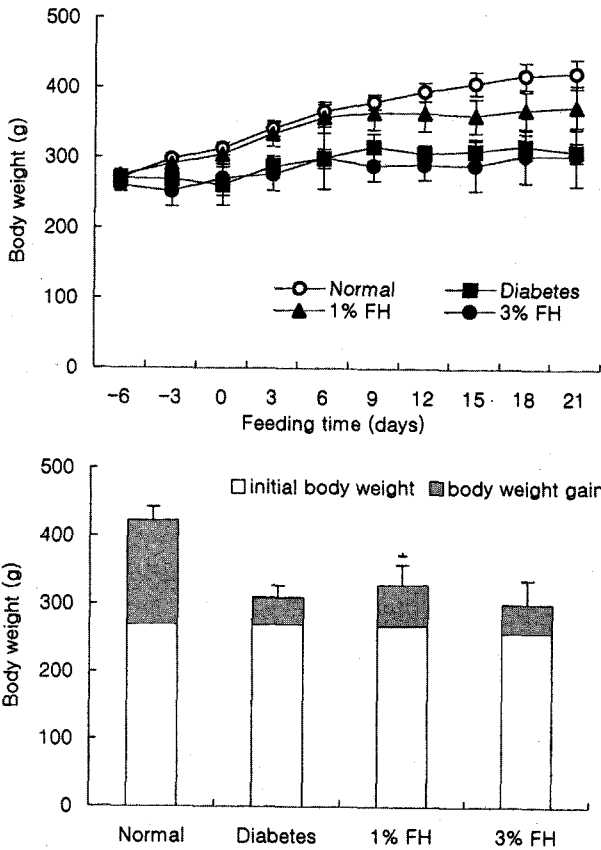


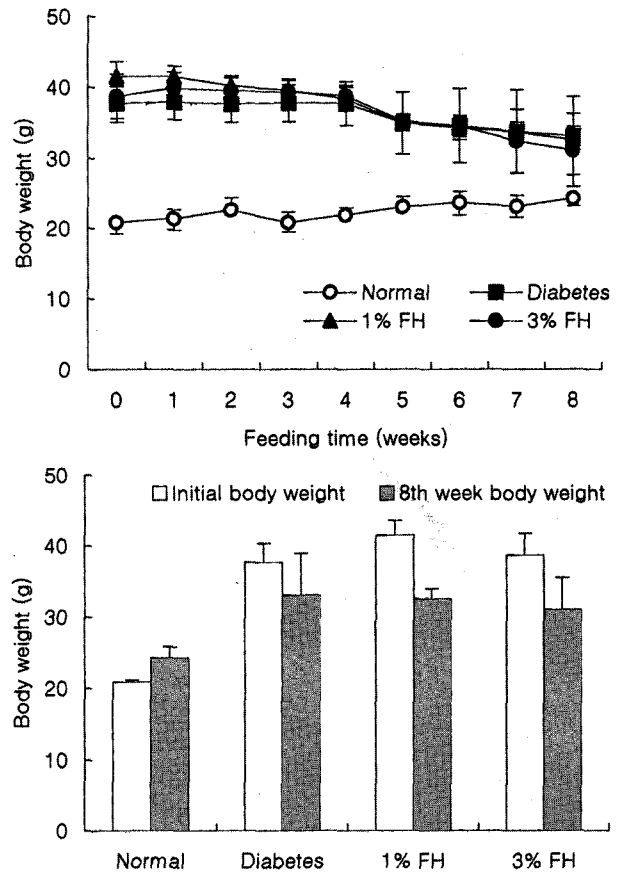
Fig. 1. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram of the acid hydrolysate of silk fibroin.



**Fig. 2.** Effect of the acid hydrolysate on body weight in STZ-induced diabetic rats. Data are mean  $\pm$  SE values for 4 rats in each group. Normal; normal control, Diabetes; diabetes control, 1% FH; 1% fibroin-hydrolysate-fed group, 3% FH; 3% fibroin-hydrolysate-fed group. \*, Significantly different from diabetes control,  $p < 0.05$ .

1,000-500 사이, 500 이하의 펩타이드 분획이 각각 fraction number 50-90번, 91-110번, 111-120번, 121번 이상에서 용출되는 것으로 확인되었다(data-not-shown). 따라서 피브로인은 산 가수분해에 의해 분자량 3,000이하(아미노산 7, 8개 이하)의 작은 펩타이드 또는 아미노산 상태로 분해되었음을 알 수 있었다.

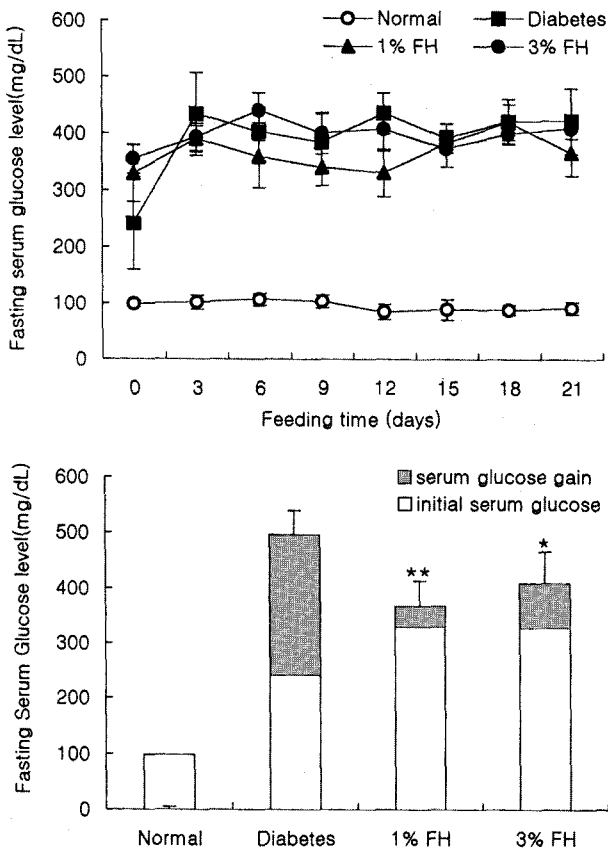
**체중의 변화** - 1) 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물 : STZ에 의해 당뇨를 유발시킨 rat의 경우 4주간의 투여기간 동안 체중증가량이 정상대조군에 비해 현저히 줄어드는 현상을 보여주었다(Fig. 2). 그러나 이러한 체중증가 감소는 1%의 산 가수분해물 투여로 인해 당뇨대조군에 비해 회복되는 현상이 유의적으로 나타났으나( $p < 0.05$ ) 그 정도는 크지 않았으며 3% 투여군에서는 당뇨대조군과의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 체중증가량이 감소하는 현상은 STZ로 인해 유발된 인슐린 의존형 당뇨병에 의한 증상으로서 1% 투여군에서 낮은 정도이지만 체중증가량의 감소현상을 완화



**Fig. 3.** Effect of the acid hydrolysate on body weight in db/db mice. Data are mean  $\pm$  SE values for 4 mice in each group. Normal; normal control, Diabetes; diabetes control, 1% FH; 1% fibroin-hydrolysate-fed group, 3% FH; 3% fibroin-hydrolysate-fed group.

시키는 효과를 보여준 것은 당뇨병에 대한 개선효과로 이해되었다. 3% 투여군에서 이러한 효과가 나타나지 않은 것은 산 가수분해물의 투여농도가 높아 대사작용에 있어 또 다른 영향을 준 것으로 추정되었다.

2) 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물 : db/db 마우스에 대한 투여실험 결과 정상(lean)대조군을 제외한 당뇨대조군 및 1% 투여군, 3% 투여군 등 모든 실험군에서 체중이 감소하였다(Fig. 3). 그러나 당뇨대조군과 1% 투여군, 3% 투여군 간의 유의적 차이는 나타나지 않아 산 가수분해물의 투여는 체중의 변화에 별 영향이 없는 것으로 나타났다. C57BL/KsJ db/db 마우스는 leptin 수용체 gene의 돌연변이로 인해 다식, 비만, 인슐린 저항성, 고혈당, 고인슐린혈증 등 인슐린 비의존형 당뇨병과 유사한 임상적 특징을 나타냄으로써 당뇨병 및 인슐린 저항성에 대한 유전적 분석에 이용되는 동물모델이다.<sup>38)</sup> 이 db/db 마우스는 생후 3개월까지 고인슐린혈증과 체중증가를 보이며 이후에는 혈중 인슐린 농도가



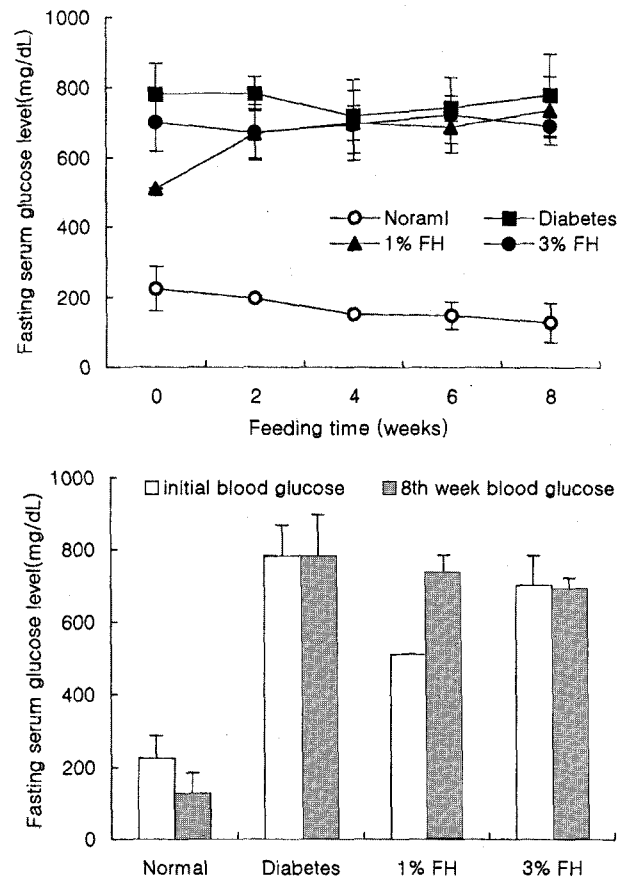
**Fig. 4.** Effect of the acid hydrolysate on fasting serum glucose level in STZ-induced diabetic rats. Data are mean  $\pm$  SE values for 4 rats in each group. Normal; normal control, Diabetes; diabetes control, 1% FH; 1% fibroin-hydrolysate-fed group, 3% FH; 3% fibroin-hydrolysate-fed group. \*, \*\*, Significantly different from diabetes control,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

점차 감소하는 경향을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 본 연구에서의 투여실험은 생후 9주째에 시작되었으므로 당뇨 대조군의 체중 변화 추이를 볼 때 투여 초기에는 체중증가가 거의 없다가 오히려 투여 후 5주째부터는 체중이 감소하는 현상이 관찰되었다. 그러나 이러한 체중 감소현상은 산 가수분해물의 투여에 의해 유의적인 변화를 줄 수 없음을 알 수 있었다.

**혈당량의 변화** - 1) 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물 : STZ에 의해 당뇨를 유발시켜 공복시 혈당치가 200 mg/dl 이상의 개체만을 선별한 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물에 대한 산 가수분해물의 투여실험 결과 당뇨대조군에서는 혈당치의 심한 상승을 나타내었다(Fig. 4). 반면 1% 및 3%의 가수분해물 투여군에서는 혈당치가 상승하기는 하나 그 상승폭이 당뇨대조군에 비해 현저하게 낮아지는 현상을 관찰할 수 있었다( $p < 0.01$  및  $p < 0.05$ ). 한편 정상대조군은 실험기

간동안 혈당치가 100 mg/dl 수준에서 변화 없이 유지되었다. 그러나 산 가수분해물의 혈당치 상승 억제효과는 유의적으로 인정되는 것이었으나 1% 투여군에 비해 3% 투여군이 오히려 효과가 낮은 것으로 나타남으로써 3% 투여는 앞의 체중증가량 감소현상의 회복효과에서의 마찬가지로 고농도 투여로 인한 반대효과가 작용하는 것으로 추정되었다. 즉 피브로인 산 가수분해물은 펩타이드는 물론 아미노산의 함량이 높기 때문에 흡수율이 높을 것으로 생각되며 또한 가수분해물 자체가 영양원으로 작용하게 되므로 다른 항당뇨 소재와 같이 투여농도에 따라 혈당강하효과가 좋아지는 결과를 얻을 수 없는 것으로 사료되었다.

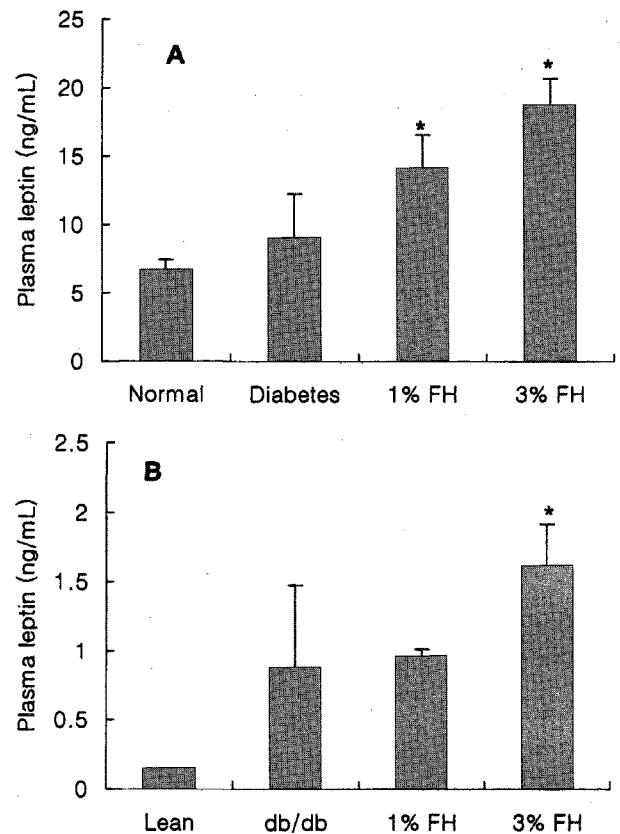
2) 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물 : db/db 마우스를 이용한 투여실험 결과 정상(lean)대조군은 투여실험기간 중 정상 혈당량으로 유지되었으며 당뇨대조군과 1% 및 3% 투여군 모두에서 혈당치가 높게 유지되어 산 가수분해물의 투여에 의한 혈당강하효과는 없음을 알 수 있었다(Fig. 5). 1%



**Fig. 5.** Effect of the acid hydrolysate on fasting serum glucose level in db/db mice. Data are mean  $\pm$  SE values for 4 mice in each group. Normal; normal control, Diabetes; diabetes control, 1% FH; 1% fibroin-hydrolysate-fed group, 3% FH; 3% fibroin-hydrolysate-fed group

투여군에서는 오히려 혈당치가 가수분해물의 투여에 의해 상승하는 결과를 보여주었으나 이는 가수분해물에 의한 영향이라기보다는 투여실험 초기의 혈당치가 당뇨대조군과 3% 투여군에 비해 낮았던 점을 감안할 때 db/db 마우스 고유의 고혈당증이 상대적으로 늦게 진전되어 발생한 현상인 것으로 판단되었다. 피브로인의 산 가수분해물이 혈당강화 작용을 나타내지 않는 이러한 결과는 기존 보고된 제2형 당뇨에 대한 피브로인 가수분해물의 항당뇨 작용의 실험결과와 상반되는 것이다. 한편 기존 보고된 항당뇨 작용에 대해 살펴본 결과 연구결과 간에 일치하지 않는 문제점이 있음을 발견할 수 있었다. 남 등<sup>31)</sup>은 C57BL/6J-ob/ob 마우스에 피브로인 수용액을 투여하여 혈당치가 유의적으로 감소하고 혈장 인슐린 농도 또한 감소하였다고 보고하고 이러한 혈장 인슐린 농도의 감소는 투여된 피브로인 수용액이 췌장 소도에 직접 영향을 미친 것이 아니라 혈당강화에 따른 2차적인 현상으로 혈중 인슐린 농도가 감소한 것으로 추정하였다. 그러나 이러한 결과는 Luo 등<sup>24)</sup>이 동일한 마우스에 피브로인 수용액을 투여하였을 때 혈중 인슐린 농도가 증가함을 관찰하여 피브로인의 인슐린 분비 촉진효과를 주장하였던 것과는 반대되는 결과이기도 하였다. 한편 도 등<sup>32)</sup>은 한국잡사학회 학술발표회를 통해 C57BL/KsJ db/db 마우스에 피브로인의 가수분해물(췌신도바이오실크 제품)을 42일간 투여한 결과 혈당은 투여 후 일주일부터 지속적으로 감소하여 42일에는 정상혈당치까지 회복되었으며 체중은 유의적인 변화가 없었고 혈중 인슐린은 유의성있게 증가하였다고 발표하였다. 이들은 피브로인 가수분해물이 db/db 마우스의 췌장(세포의 인슐린 분비능을 향상시켜 혈당강화효과를 나타낸 것으로 추정하였으나 후속 연구논문이 학회지 등에 발표되지 않아 구체적인 실험결과를 파악할 수 없었다. 그러나 본 연구에서는 동일한 모델동물을 사용하여 피브로인 가수분해물 투여실험에서 혈당강화효과가 없음을 확인함으로써 또다시 연구결과가 일치하지 않음을 보여주었다. 이렇듯 피브로인 및 그 가수분해물을 이용한 연구결과와 인슐린 분비촉진에 대한 해석이 서로 다른 가운데, 본 연구에서는 혈중 leptin 농도의 변화추이를 통해 피브로인 가수분해물의 작용을 분석해보기 위하여 산 가수분해물 투여에 의한 혈중 leptin 농도의 변화를 측정하였다.

**혈중내 leptin의 농도** - 1) 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물 : STZ에 의해 당뇨를 유발시킨 인슐린 의존형 당뇨병 모델 rat에서 혈중 leptin 농도를 측정된 결과 정상대조군과 당뇨대조군에서는 별다른 차이가 없었으나 피브로인 산 가수분해물의 1% 및 3% 투여군에서는 투여농도에 따라 유의적인 leptin 농도 증가현상이 관찰되었다( $p < 0.05$ , Figure 6A). Leptin은 인슐린의 분비가 증가될 때 그 합성이 촉진되어 혈



**Fig. 6.** Effect of the acid hydrolysate on plasma leptin concentration in (A) streptozotocin-induced diabetic rats fed for 3 weeks and (B) db/db mice fed for 8 weeks. Data are mean $\pm$ SE values for 4 mice in each group. Normal; normal control, Diabetes; diabetes control, 1% FH; 1% fibroin-hydrolysate-fed group, 3% FH; 3% fibroin-hydrolysate-fed group. \*, Significantly different from diabetes control,  $p < 0.05$ .

중 leptin 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>35)</sup> 즉 피브로인 산 가수분해물의 투여에 의해 혈중 leptin 농도가 증가한 것은 인슐린 분비가 촉진되었음을 의미함을 알 수 있었고, STZ에 의해 인슐린 의존형 당뇨병이 유발된 SD rat에서 혈당치 상승이 억제된 효과는 STZ에 의해 손상되었던 췌장 소도( $\beta$  세포)의 인슐린 분비능이 가수분해물 성분에 의해 회복 또는 촉진된 결과로 추정되었다. 이는 Havel 등<sup>32)</sup>에 의해 보고된 바와 같이 STZ에 의해 당뇨유발된 제1형 당뇨 모델동물에서 혈중 leptin의 농도가 빠르게 감소하고 이러한 감소는 인슐린 처리에 의해 회복된다는 연구결과에 의해 뒷받침됨을 알 수 있었다.

2) 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물 : db/db 마우스에서의 혈중 leptin 농도를 측정 결과, db/db 마우스의 임상적 특징으로 인해 정상대조군보다 당뇨대조군에서의 혈중 leptin 농도가 현저하게 높게 나타났다(Figure 6B). 8주간의 피브

로인 가수분해물 투여 후의 혈중 leptin 농도를 보면 1% 투여군의 경우에는 유의성은 인정되지 않았지만 약간 증가되는 경향이 보였고, 3% 투여군의 경우에는 유의적으로 증가함을 관찰할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 즉 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물에서도 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물에서와 같이 혈중 leptin 농도가 피브로인 가수분해물의 투여량에 따라 증가하는 경향이 나타남으로써 결국 피브로인 산 가수분해물이 인슐린 분비를 촉진시키는 것으로 판단되었다. 그러나 한편으로는 도 등<sup>32)</sup>의 보고와는 달리 인슐린 분비가 촉진되었음에도 불구하고 혈당강하효과가 나타나지 않은 것은 인슐린 의존형 당뇨병과는 달리 인슐린 비의존형 당뇨병은 인슐린 저항성이 주된 발병요인이기 때문에 피브로인 가수분해물에 의한 인슐린 분비 촉진이 혈당치를 저하시키는 데에는 기여하지 못한 것으로 추정되었다. db/db 마우스의 임상적 특징을 볼 때 고인슐린 혈증과 고혈당이 동시에 나타나고 유지되는 것을 감안하면 이러한 추정이 타당성이 있음을 알 수 있다.

## 결 론

최근 새로운 생리활성소재로 주목받고 있는 실크 피브로인에 대한 항당뇨 작용을 인슐린 의존형 및 비의존형 당뇨병 모델동물을 통하여 분석하였다. STZ 주사를 통해 당뇨를 유발시킨 SD rat을 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물로 하여 피브로인 산 가수분해물을 투여한 결과 체중 증가량의 감소현상을 완화시켜주는 한편 혈당치 상승이 유의적으로 억제되었다. C57BL/Ksj-db/db 마우스를 인슐린 비의존형 당뇨병 모델동물로 이용하여 피브로인 산 가수분해물을 투여한 결과 인슐린 의존형 당뇨병 모델동물의 경우와는 달리 체중의 변화에도 영향이 없었으며 혈당강하효과도 나타나지 않았다. 피브로인 및 그 가수분해물에 의한 혈당강하 또는 인슐린 분비촉진 효과에 대해서는 기존 보고된 연구결과들이 서로 일치하지 않고 있는 만큼 본 연구에서는 혈중 leptin 농도의 변화를 나타내는 결과에 의해 인슐린 분비촉진 효과에 대한 평가를 내릴 수 있었다. 즉 인슐린 의존형 및 비의존형 당뇨병 모델동물에서 동일하게 피브로인 가수분해물의 투여에 의해 혈중 leptin 농도가 증가하며 또한 투여농도에 따라 증가량도 높아지는 현상이 관찰되었다. 이러한 결과로부터 피브로인 가수분해물의 인슐린 분비촉진 효과를 확인할 수 있었으며 인슐린 의존형 또는 비의존형 모델동물에서 각각 체중의 변화와 혈당강하효과가 다르게 관찰되는 것은 해당 당뇨병의 기작이 다르기 때문인 것으로 판단되었다. 즉 피브로인 산 가수분해물에 의해 췌장 소도의 인슐린 분비능은 회복 또는 촉진되나 인슐린 비의존형

당뇨병 모델동물에서는 발병원인이 인슐린 저항성에 있으며 고인슐린 혈증과 고혈당이 동시에 나타나는 임상적 특징을 고려할 때 인슐린 분비능 촉진이 혈당강하작용에는 기여하지 못하는 것으로 추정되었다.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로서(HMP-00-B-22000-0150), 연구비 지원에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Bailey, C. J. (1999) Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **58**(10): 1511-1520.
2. Zhang, B. B. and Moller, D. E. (2000) New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**(4): 461-467.
3. Parker, J.C., Andrews, K.M., Rescek, D.M., Masefski, Jr., Andrews, G.C., Contillo, L.G., Stevenson, R.W., Singleton, D.H. and Suleske, R.T. (1998) Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs. *J. Peptide Res.* **52**(5): 398-409.
4. Burcelin, R., Dolci, W. and Thorens, B. (1999) Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism* **48**(2): 252-258.
5. Shokuhin to Kaihatsu Henshubu (2000) Market trend of health foods and health ingredients. *Shokuhin to Kaihatsu* **35**: 18-34.
6. 김옥경, 박수영, 조경혜(1991) 닭의장풀 추출액의 혈당강하 및 효소활성 변화에 미치는 영향. *생약학회지* **22**: 225-232.
7. 김옥경, 이은방(1992) 혈당 강하 작용 식물의 검색(I). *생약학회지* **23**: 117-119.
8. 김옥경, 이은방, 강삼식(1993) 두릅나무 근피의 혈당강하 성분 관련 연구(II) - 유효성분의 분리 및 작용. *생약학회지* **24**: 219-222.
9. 이주선, 최명현, 정성현(1995) 상업의 혈당강하 활성. **39**: 367-372.
10. 정기화, 김박광, 조술연, 이재신, 한혜경, 박만기, 정춘식, 박정일(1997) 수종 생약의 혈당강하작용. *생약학회지* **28**: 72-74.
11. 안세영, 두호경, 정성현, 이성현(1999) db/db 마우스에서 상백피탕의 혈당강하 활성 및 기전연구. *약학회지* **43**: 818-826.
12. 김윤영, 조여원, 정성현, 구성자(1999) db/db 마우스에서 상백피의 혈당강하효과. *한국식품과학회지* **31**: 1057-1064.
13. 이성현, 안세영, 두호경, 정성현(1999) db/db 마우스에서

- 수풍순기환의 혈당강하 활성 및 기전연구. *응용약물학회지* 7: 335-341.
14. Lee, Y. G. and Kim, S. D. (2000) Effect of Palmi-won on diabetes-prone BB rats. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 157-162.
  15. 최혁재, 김남재, 김동현(2000) 석이에서 분리한 GE974의 혈당상승억제효과 Hypoglycemic Effect of GE974 isolated from *Gyrophora esculenta* in Normal and Diabetic mice. *생약학회지* 31: 268-272.
  16. 김철영, 강시현, 정기화, 정춘식, 김박광, 허훈(2000) 혈당강하효과를 나타내는 상업의 당지질 성분. *생약학회지* 31: 95-100.
  17. Chen, F., Nakashima, N., Kimura, I., and Kimura, M. (1995) Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium Mori*) and Cortex Mori Radicis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 115: 476-482.
  18. 김진엽, 박중열, 이기업(1994) 당뇨병과 민간요법 : 달개비풀, 인삼, 달맞이꽃 종자유 등이 스트렙토조토신 당뇨백서에서 포도당 대사에 미치는 영향. *당뇨병* 18: 377-381.
  19. 이정선, 손홍수, 맹영선, 장유경, 주진순(1994) 메틸글루카 Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 장기무게 및 당질과 지질대사에 미치는 영향. *한국영양학회지* 27: 819-827.
  20. 임숙자, 김수연, 이주원(1995) 한국산 야생식용식물이 당뇨유발 흰쥐의 혈당 및 간과 근육내 에너지원 조성에 미치는 영향. *한국영양학회지* 28: 585-594.
  21. 임숙자, 김계진(1995) 등글레(*Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum Ohwi*) 추출물의 당뇨 유발 흰쥐에 대한 혈당강하 효과. *한국영양학회지* 28: 727-736.
  22. 김박광, 신준수, 김경순, 정기화, 정춘식, 고광호, 박정일, 허훈(1997) 구기자의 혈당강하작용. *생약학회지* 28: 138-142.
  23. 김경순, 심상희, 정기화, 정춘식, 고광호, 박정일, 허훈, 이봉진(1998) 구기자 성분의 혈당강하 작용. *응용약물학회지* 6: 378-382.
  24. Luo, J., Chen, K., Xu, Q., and Hirabayashi, K. (1993) Study on foodization of fibroin and its functionality, *In The collection of papers for the second international silk conference*, 73-87, China.
  25. Akai, H. (1999) New physiological functions of silk material, *Shokuhin to Kaihatsu* 34: 45-47.
  26. Gotoh, K., Izumi, H., Kanamoto, T., Tamada, Y., and Nakashima, H. (2000) Sulfated fibroin, a novel sulfated peptide derived from silk, inhibits human immunodeficiency virus replication *in vitro*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1664-1670.
  27. Takano, R., Hirabayashi, K., and Chen, K. (1991) Preparation of soluble silk fibroin powder by hydrochloric acid hydrolysis. *Sov. Phys. Crystallogr.* 60: 358-362.
  28. Chen, K., Umeda, Y., and Hirabayashi, K. (1996) Enzymatic hydrolysis of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* 65: 131-133.
  29. Kim, M. K., Lee, K. H., Lim, H. J., Lee, S. J., Lee, S. H., and Min, K. S. (1996) Preparation protocols for the functional polypeptide materials from cocoon. *Korean Patent* 98712.
  30. Kim, D. K., Kim, Y. H., Kim, K. B., and Chin, Y.G. (2001) The changes of molecular weight and structure in the preparation process of silk fibroin powder. *J. Kor. Fiber Soc.* 38: 105-110.
  31. Nahm, J. H. and Oh, Y. S. (1995) A Study of pharmacological effect of silk fibroin, *RDA J. Agric. Sci.* 37: 145-157.
  32. 도선길, 서준교, 김중섭, 강경돈, 남중희, 이문한, 오양석 (1999) Silk fibroin의 당뇨병 치료제로서의 개발. *한국잡사학회* p.23, 1999년도 춘계학술연구 발표자료.
  33. Girard J. (1997) Is leptin the link between obesity and insulin resistance? *Diabetes Metab. 23 Suppl* 3: 16-24.
  34. Havel, P. J., Uriu-Hare, J. Y., Liu, T., Stanhope, K. L., Stern, J. S., Keen, C.L., and Ahren, B. (1998) Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am. J. Physiol.* 274: R1482-R1491.
  35. Ahren, B., Mansson, S., Gingerich, R. L., and Havel, P. J. (1997) Regulation of plasma leptin in mice : influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am. J. Physiol.* 273: R113-R120.
  36. Ajisawa, A. (1970) Studies on the dissolution of silk fibroin. VI. The dissolution of silk fibroin and osmotic of neutral salt aqueous solution. *J. Seric. Sci. Jpn.* 39: 139-142.
  37. Hyun, C. K. and Shin, H. K. (2000) Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.* 36: 65-71.
  38. Stanley, M. and Lee, S. B. (1986) Chronic effects of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (Bay O 1248) on intestinal disaccharidase activity in normal and diabetic mice. *J. Pharm. Exp. Therapeutics* 240: 132-137.

(2002년 1월 14일 접수)