

뽕잎과 누에가루 혼합환의 Streptozotocin 유발 당뇨쥐에서의 혈당강하 효과

장미진 · 이순재[†]

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Hypoglycemic Effects of Pills Made of Mulberry Leaves and Silkworm Powder in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Mi-Jin Jang and Soon-Jae Rhee[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract

This study was carried out to examine the effects of pills made of mulberry leaves and silkworm powder on lowering blood glucose level. Experimental animals were Sprague-Dawley male rat weighing 100 ± 10 g and pills were supplemented with 0.4% (4 g/kg) diet. Experimental groups were assigned to diabetic group (DM group) and pill supplemented groups. Pill supplemented groups were classified 100% mulberry leaves (M group), mixing 25% silkworm powder to mulberry leaves (25SM group), mixing 50% silkworm powder to mulberry leaves (50SM group), mixing 70% silkworm powder to mulberry leaves (75SM group) and 100% silkworm powder (100S group). Experimental diets and water fed *ad libitum*, and streptozotocin was injected to induce diabetic state after 3rd weeks and sacrificed on the 9th day. The contents of 1-deoxynojirimycin (DNJ) were increased with adding the silkworm powder. The contents of GABA and rutin were increased with adding the mulberry leaves. *In vitro*, intestinal mucosa α -glucosidase inhibitory activities were significantly increased in pills which mixed with silkworm powder by 50%. Blood glucose levels were high in groups which mixed with silkworm powder by 50% compared to DM group. Intestinal mucosa maltase activity in proximal part was significantly reduced in pill supplemented group compared to DM group and pill supplemented groups were no significant difference. Enzyme activity in middle part was no significant difference in experimental groups. Enzyme activity in distal part was decreased in pill supplemented groups, especially in 50SM, 75SM and 100S groups were significantly reduced compared to DM group. Sucrase and lactase activities in pill supplemented groups were significantly reduced at proximal part, and there was no significant difference in middle and distal parts. In conclusion, pills made of mulberry leaves and silkworm powder increased the α -glucosidase inhibitory activity *in vitro* and reduced the blood glucose levels by controlling the disaccharidase activities of intestinal proximal part in STZ-induced diabetic rat. The synergistic effect was the highest when mulberry leaves was mixed with silkworm powder by the ratio of 50:50.

Key words: pills made of mulberry leaves and silkworm powder, blood glucose, disaccharidase, diabetic rats

서 론

현재 우리나라의 당뇨병에 의한 사망률은 1990년 인구 십만 명당 11.8명에서 2001년에는 23.8명으로 10년 간 배로 늘어났으며, 이는 계속적인 증가추세에 있다(1). 당뇨병에서 고혈당이 조절되지 않고 만성화될 경우 고지혈증, 고혈압 및 동맥경화 등의 심혈관성 장애를 비롯한 여러 합병증이 초래된다(2). 당뇨 합병증은 비효소적 당화, 자동 산화적 당화의 증가 및 항산화 방어계의 변화에 의해 촉진되며, 이러한 변화는 혈장과 조직의 산화적 스트레스와 지질과산화물 생성을 증가시키고 나아가 혈관성 기능 장애를 유발시킨다(3-5). 따라서 당뇨 및 합병증을 예방하기 위해서는 우선적으로 고

혈당 상태의 교정과 함께 산화적 스트레스를 억제시키는 것이 필수적이다. 이에 당뇨병의 치료 및 합병증 예방을 위해 하늘타리(6), 둥글레(7), 구기자(8), 녹차(9) 및 참마(10) 등의 여러 가지 천연소재를 이용한 기능성 식품 개발이 시도되고 있으며, 그 외에도 최근에는 오디, 뽕잎 및 누에 등의 잠상산물을 이용한 연구가 많이 진행되고 있다(11-15).

잠상산물 가운데 뽕잎은 뽕 나무과(Moraceae)에 속하는 식물로 수천 년간 누에의 먹이공급원으로 이용되어 왔으며 1998년, 식품공전에 등재된 후 뽕잎을 이용한 가공식품 및 건강보조식품 개발에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(16-19). 뽕잎에 존재하는 성분은 크게 휘발성 성분과 비휘발성 성분으로 나눌 수 있는데, 휘발성 성분으로는 guaiacol,

[†]Corresponding author. E-mail: sjrhee@cu.ac.kr
Phone: 82-53-850-3523, Fax: 82-53-850-3504

methyl salicylate, benzaldehyde 및 phenylacetaldehyde 등 (11)이 있으며 비휘발성 성분으로는 rutin, quercetin, isoquercetin 및 kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside 등의 flavonoid류가 많이 있다(12-14). Flavonoid 가운데 rutin은 모세혈관 강화작용과 수축작용을 나타낸다. 팽잎의 γ -aminobutyric acid(GABA) 성분은 혈압 강하물질로서 작용하며 함량이 녹차 잎의 약 10배 정도 높다. 또한 팽잎에는 β -sitosterol, campesterol, β -sitosterol glycoside, β -ecdysone 및 inosterone 등의 식물성 스테롤이 다량 존재하여 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 저하작용, HDL-cholesterol 치의 증가 및 강력한 항산화 작용을 나타낸다(13-19).

누에분말은 누에나방과에 속하는 유충으로서 신농경초본(神農經草本)의 중품에 수재되어 있다. 누에 중의 deoxynojirimycin(DNJ)은 장내 탄수화물을 분해하는 효소인 α -glucosidase의 활성을 경쟁적으로 억제하여 식후 급격히 상승하는 혈당을 조절하는 것으로 알려지고 있다(20). 따라서 실험동물을 대상으로 하여 누에분말의 항당뇨 효과를 중점으로 많은 연구가 진행되고 있다(21-23). 또한 인슐린 비의존형 당뇨병자에게 누에분말 500 mg을 투여했을 때 65%의 혈당강하 효과를 보였다는 보고가 있으며, 그 외에도 누에의 여러 가지 생리기능이 보고되고 있다(24-28). 이와 같이 누에가루는 DNJ 성분 등으로 인한 혈당강하 효과가 매우 우수하며, 팽잎은 GABA 및 flavonoid 등의 성분이 골고루 포함되어 있어 중성지방이나 콜레스테롤 저하작용 및 항산화 작용 등을 비롯한 다양한 기능을 지니고 있다. 그러므로 이들을 적절한 비율로 혼합하여 각각 그 기능성의 우수한 점을 이용한다면 시너지 효과를 거둘 수 있을 것이다. 그러나 지금까지 팽잎과 누에가루의 혼합비율을 달리하여 그 효능을 검정한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 팽잎과 누에가루의 혼합 비율을 달리하여 환의 형태로 만들고 제조된 환의 혈당저하 효과 및 당류 분해효소의 활성에 미치는 영향을 조사하여 기능성 식품으로써의 활용방안을 모색하는데 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

팽잎 및 누에의 준비

실험에 사용한 팽잎은 'YK-209 팽잎'으로 2002년 5월 경북 영천에서 채취하여 수세한 후 60°C에서 열풍 건조·파쇄하여 이용하였다. 누에가루는 '영천양잠농업협동조합'에서 사육한 누에 중 5주령 3일된 것을 급속 동결 건조·파쇄하여 사용하였다.

환의 제조

건조된 팽잎가루를 기본으로 하여 누에가루를 넣은 다음 부형제인 찹쌀 풀 100 g과 물 150 g을 넣어 검수 및 계량한 다음 30 L통에 넣어 잘 배합하여 반죽하고, 장환기로 국수면 같이 일정한 굵기로 자른 후 제환기로 일정한 크기로 잘라

정환기로 완전한 환 모양으로 만들었다. 이때 팽잎 100%를 이용하여 만든 환을 M 환, 팽잎에 누에가루를 25%, 50% 및 75%의 비율로 혼합하여 만든 환을 각각 25SM 환, 50SM 환 및 75SM 환, 누에가루 100%를 이용하여 만든 환을 100S 환이라 하였으며, 60°C에서 4시간 동안 건조기에서 열풍 건조 하여 수분 함량이 5~8%가 되도록 한 다음 병에 넣어서 밀봉하여 시료로 사용하였다.

제조환의 1-deoxynojirimycin(DNJ), γ -aminobutyric acid(GABA) 및 rutin 함량 분석

DNJ 함량 측정은 Stead and Richards(29)의 방법으로 분석하였다. 즉, 제조한 환 0.1 g에 증류수 10 mL를 가하여 1시간 동안 ultrasonication(Bransonic, USA)한 후 30초 동안 vortexing 하였다. 다시 60°C에서 1시간 동안 추출한 후 12,000 rpm에서 15분 간 원심분리하여 상등액을 모았다. 위의 방법을 2회 반복 추출하여 얻어진 상등액을 증류수로 100 mL가 되도록 희석하였다. 1.5 mL eppendorf tube에 환 추출물 10 μ L, 0.4 M borate buffer(pH 8.5) 10 μ L 및 5 mM FMOC-Cl(in CH_3CN) 20 μ L를 첨가한 후, 20°C water circulator에서 20분 간 반응시킨 후 20°C로 유지된 0.1 M glycine 10 μ L를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응액에 0.1% acetic acid 950 μ L를 첨가한 후, 0.2 μ M syringe filter(Nalgene, nylon filter)에 통과시킨 후 미리 24°C를 유지하고 있는 HPLC (high performance liquid chromatography)에 autosampler를 이용하여 10 μ L씩 주입하여 분석하였다. 표준용액은 표준품 5 mg을 취하여 증류수 1 mL에 용해시켜 사용하였다. HPLC (Spectra System HPLC ThermoQuest, USA)의 분석 조건은 다음과 같다. 사용한 칼럼은 phenomenex Luna C_{18} column (4.6 \times 250 mm), 측정온도는 30°C, 유속은 1 mL/min, 형광검출기는 여기파장 254 nm 및 방사파장 322 nm를 사용하였다. 그리고 이동상으로는 0.1% AcOH : CH_3CN (50 : 50 v/v)을 사용하여 isocratic elution시켰다.

GABA는 Bang 등(30)의 방법으로 분석하였다. 제조한 환 1 g에 4% sulfosalicylic acid 용액 20 mL를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 초음파 추출하였다. 추출한 시료를 4°C에서 60분 동안 방치한 후 원심분리(12,000 rpm, 5°C, 15 min)하여 단백질을 침전시켰다. 여기서 얻은 상등액과 동량의 Uriprep (contain lithium ion)을 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 후 침전되는 단백질을 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 5 min)하여 제거하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 syringe filter (0.45 μ M)로 여과하여 아미노한 자동분석기(Pharmacia Biotech Co., Biochrom 20, Sweden)를 사용하여 GABA 함량을 측정하였다. 기기분석 조건으로는 칼럼은 Li-form을, retention time은 110 min, loading volume은 40 μ L, 유속은 0.3 mL/min, UV/Vis detector는 570 nm를 그리고 이동상으로는 10 mM sodium phosphate(pH 2.5)와 20 mM sodium phosphate (pH 7.5)를 사용하였다.

Rutin은 Yun과 Lee(31)의 방법으로 분석하였다. 제조한

환을 100 mesh 이하로 마쇄한 후 1 g에 80% 수용성메탄올 100 mL를 가하여 상온에서 magnetic stirrer로 12시간 동안 2회 반복 추출하여 여과지(Whatman No.2)를 통과하여 rotary vacuum evaporator(N-N series, Eyela, Japan)로 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 다시 20% 수용성메탄올 10 mL로 현탁하여 1일 방치 후, 2 mL를 취하여 CH₃Cl₂ 50 mL를 가하여 분획하여 탈지 및 탈색하고 다시 *n*-BuOH 50 mL를 가하여 2회 반복하여 분획하였다. 여기에서 얻어진 상등액은 Na₂SO₄와 혼합하여 수분을 제거한 후 농축하여 80% 수용성메탄올 4 mL에 용해한 후 0.45 µm membrane filter (Gelman, USA)로 여과한 다음 HPLC(Spectra System HPLC ThermoQuest Co.)를 사용하여 분석하였다. 사용한 컬럼은 C₁₈ column(3.9×300 mm), 유속은 0.8 mL/min, detection은 350 nm 그리고 이동상으로는 2.5% AcOH:MeOH:CH₃CN(70:10:20, v/v/v)을 사용하였다.

혈당강하 효과의 측정 등

소장 점막으로부터 α-glucosidase 효소원의 분리 : 실험동물은 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley 중 수컷을 사용하였으며, Rhinehart 등(32)의 방법으로 12시간 절식시킨 후 가벼운 ether 마취 하에서 복부를 절개하여 소장을 적출하고 유리판 위에서 점막을 긁어모았다. 점막에 5배량(w/v)의 0.5 M NaCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA(pH 7.0) 용액을 가하여 Potter-Elvehjem homogenizer(Wheaton Co., USA)로 5분간 균질화한 후 14,000 rpm에서 30분 간 원심 분리하였다. 이 과정을 3번 반복하여 얻은 침전에 5배의 0.9% NaCl 용액을 가하여 7,000 rpm에서 30분 간 원심분리하고 상층액을 얻어 -80°C에서 보관하였다가 혈당강하 효과를 측정하는데 효소원으로 사용하였다.

α-Glucosidase 활성억제 효과

α-Glucosidase 활성억제 정도는 Kim(33)의 방법으로 1.4 mU/mL α-glucosidase와 실험 sample을 pH 5.0, 37°C에서 10분간 preincubation한 후, 기질인 6 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside를 가하여 37°C에서 30분 간 반응시켜 100°C에서 3분 간 끓인 후 0.4 M glycine buffer(pH 10.4)를 가하여 원심분리하여 상층액을 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였으며, 이때 DMSO의 농도는 α-glucosidase의 저해활성에 영향을 주지 않는 농도인 10 µL/mL로 하였다. 대조군은 먼저 100°C에서 3분 간 가열한 α-glucosidase에 기질을 가하여 반응시킨 것으로 하였으며, 소장 점막으로부터 분리된 α-glucosidase는 반응시간 30분 후의 흡광도가 1.0 정도가 되도록 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 희석하여 사용하였다. 효소활성 억제 정도는 반응시간 동안의 흡광도의 변화를 대조군 흡광도 변화와의 비로부터 계산하였다.

동물실험을 통한 항당뇨 효과 검증

실험동물, 식이조성 및 사육 : 실험동물은 환경에 적응

시키기 위해 일반 고형사료(바이오 제노믹스, 한국)로 일주일 간 예비사육한 후, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 다음의 여섯 군으로 나누었다. 식이 kg 내에 0.4%(4 g)씩 혼합되는 제조환의 종류에 따라 제조환을 공급하지 않은 당뇨대조군(DM group), 뽕잎 100%로 제조한 환 공급군(M group), 뽕잎에 누에가루를 각각 25%, 50% 및 75% 혼합하여 제조한 환 공급군(25SM group, 50SM group and 75SM group) 및 누에가루 100%로 제조한 환 공급군(100 S group)으로 나누었다. 실험쥐는 각 그룹 당 10마리로 하였으며, 총 4주 간 사육하였다. 기본 실험 식이는 Table 1과 같다. 식이는 4°C에서 보관하였으며 매일 일정 시간에 공급하여 자유로이 섭취하게 하였다.

흰쥐의 당뇨 유발

인슐린 의존성 당뇨병과 유사한 실험 모델을 만들기 위해서 streptozotocin(STZ)을 50 mg/kg body weight를 꼬리 정맥을 통하여 주사하여 당뇨를 유발시킨 후 9일 만에 희생시켜 혈당량이 300 mg/dL이상인 동물만 실험에 사용하였다.

혈액 및 장기 채취

실험종료 후 가벼운 ether마취 하에서 복부대동맥으로부터 혈액을 채취한 후 즉시 소장을 채취하였다. 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분 간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

혈당측정

혈당측정은 enzymatic kit AM 102K(아산제약, 한국)를 사용하여 enzymatic method에 의해 500 nm에서 비색 정량하였다.

소장 점막의 이당류 분해효소 활성 측정

소장점막 중의 maltase, sucrase 및 lactase, 활성은 Dahlqvist(34)의 방법으로 하였다. 먼저 절제한 소장의 십이지장 부분을 제거한 후 같은 길이로 세 등분하여 proximal, middle 및 distal로 구분하고 냉장시킨 생리 식염수로 깨끗하게 씻어 cheese cloth로 수분을 제거하였다. 냉각 판에서 microscopic glass를 이용하여 점막을 긁어서 무게를 달고 4배의 증류수를 넣어 homogenizer로 균질화시켜 측정 시료로 사용하였다. 활성 측정은 희석시킨 시료 0.1 mL와 기질용액(0.056 M disaccharide solution/ 0.1 M sodium malate buffer (pH 6.0)) 0.1 mL를 시험관에 넣고 잘 혼합해서 37°C 수욕 중에서 60분 간 반응시킨 다음 증류수 0.8 mL를 첨가하여 2분 간 끓여 반응을 중지시켰다. 여기에서 0.5 mL를 시험관에 취하여 glucose oxidase 용액 3 mL를 첨가한 후 37°C 수욕 중에서 1시간 반응시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량

각 시료의 단백질량은 Lowry 등(35)의 방법으로 하였으며, bovine serum albumin을 표준품으로 사용하였다.

Table 1. Composition of diets in experiment groups

(g/kg diet)

Ingredients	Groups ¹⁾						
	DM	M	25SM	50SM	75SM	100S	
Corn starch ²⁾	698	694	694	694	694	694	694
Casein ³⁾	150	150	150	150	150	150	150
DL-methionine ⁴⁾	2	2	2	2	2	2	2
Corn oil ⁵⁾	50	50	50	50	50	50	50
Salt mixture ⁶⁾	40	40	40	40	40	40	40
Vitamin mixture ⁷⁾	10	10	10	10	10	10	10
Cellulose ⁸⁾	50	50	50	50	50	50	50
Pills ⁹⁾							
Mulberry leaves	-	4	3	2	1	-	-
Silkworm powder	-	-	1	2	3	4	-
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾DM: Injection of STZ+without any supplement of production pill.

M: Injection of STZ+4 g mulberry leaves (100%).

25SM: Injection of STZ+3 g mulberry leaves (75%) and 1 g silkworm powder (25%).

50SM: Injection of STZ+2 g mulberry leaves (50%) and 2 g silkworm powder (50%).

75SM: Injection of STZ+1 g mulberry leaves (25%) and 3 g silkworm powder (75%).

100S: Injection of STZ+4 g silkworm powder (100%).

The diet of experiment groups were supplemented with 0.4% (4 g/kg) the mixtures.

²⁾Pung jin Chem. Co., Seoul, Korea.³⁾Lactic Casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wellington, N.Z.⁴⁾Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri, USA.⁵⁾Dong Bang Oil Co., Seoul, Korea.⁶⁾AIN-76 (g/kg mixture): Calcium phosphate, dibasic (CaHPO₄ · 2H₂O) 500, Sodium chloride (NaCl) 74, Potassium citrateminohydrate (K₃C₆H₅O₇ · H₂O) 220, Potassium sulfate (K₂SO₄) 52, Magnesium oxide (MgO) 24, Manganous carbonate (45~48% Mn) 3.5, Ferric citrate (16~17% Fe) 6, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cuppric carbonate (53~55% Cu) 0.3, Potassium iodate (KIO₃) 0.01, Sodium selenite (Na₂SeO₃ · 5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate [CrK (SO₄)₂ · 12H₂O] 0.55, filled up to 1,000 with sucrose.⁷⁾ALN-76 (mg/kg mixture): Thiamin-HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine · HCl 700, Nicotinic acid (nicotinamide in equivalent) 3,000, D-calcium pantothenate 1,600, Folic acid 200, D-biotin 20, Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) 1, Retinyl palmitate or acetate (Vitamin A) as stabilized powder to provide 400,000 IU Vitamin A activity or 120,000 retinol equivalent, DL- α -tocopheryl acetate 5,000 IU, Cholecalciferol (100,000 IU, may be in powder form) 2.5, Menaquinone (Vitamin K, Menadione) 5, filled up to 1,000 with sucrose.⁸⁾Sigma Chem. Co. CMC (sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber), St. Louis, Missouri, USA.⁹⁾Mulberry leaves: YK-209 mulberry leaves powder.

Silkworm powder: Silkworm fed YK-209 mulberry leaves.

통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 분산분석(ANOVA 검증)결과 유의성이 발견된 경우 Tukey's HSD test에 의해 군 간의 유의도를 분석하였다.

결과 및 고찰

제조환의 기능성 성분인 1-deoxynojirimycin(DNJ), γ -aminobutyric acid(GABA) 및 rutin 함량 분석

제조환의 기능성 성분의 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 혈당강하 성분인 DNJ의 경우 M 환, 25SM 환, 50SM 환, 75SM 환 및 100S 환에서 100 g 당 각각 68±7.67 mg, 95±13.64 mg, 118±10.19 mg, 143±9.25 mg 및 168±12.15 mg으로 누에가루를 혼합함으로써 함량이 증가되었다. 이는 뽕잎보다 누에가루에 DNJ가 더 많이 함유되어 있기 때문으로 본다(11-13).

혈압상승 억제제이며 인체 내의 신경계나 혈액에 함유되

Table 2. Functional ingredient contents of pills made of mulberry leaves and silkworm powder on 1-deoxynojirimycin (DNJ), γ -aminobutyric acid (GABA) and rutin

(mg/100 g dry weight)

Groups	DNJ	GABA	Rutin
M	68±7.67 ^{1)c2)}	131±9.14 ^a	11±0.41 ^a
25SM	95±13.64 ^{bc}	109±10.21 ^{ab}	10±0.62 ^{ab}
50SM	118±10.19 ^b	87±11.09 ^b	9±0.39 ^b
75SM	143±9.25 ^a	64±9.01 ^c	8±0.54 ^c
100S	168±12.15 ^a	42±10.08 ^c	7±0.48 ^c

Experimental conditions are same as Table 1.

¹⁾All values are mean±SE (n=10).²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

어 있고, 뇌하수체 중에 존재하여 억제성 신경전달물질로 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는(33) GABA는 M 환, 25SM 환, 50SM 환, 75SM 환 및 100 S 환에서 100 g 당 각각 131±9.14 mg, 109±10.21 mg, 87±11.09 mg, 64±9.01 mg 및 42±10.08 mg으로 제조환 중의 뽕잎의 비율이 늘어남에 따라 함유량이 증가되었다.

Flavonoid의 일종으로 모세혈관 강하작용 및 수축작용, 순환계 질환 치료제 및 고혈압 치료제 등의 주성분이며 방사선 치료의 부작용을 줄이는 역할을 하는 rutin은 M 환, 25SM 환, 50SM 환, 75SM 환 및 100S 환에서 100 g 당 각각 11 ± 0.41 mg, 10 ± 0.62 mg, 9 ± 0.39 mg, 8 ± 0.54 mg 및 7 ± 0.48 mg씩 함유되어 GABA와 같은 경향을 나타내었다. 이러한 결과들은 뽕잎이 누에 가루보다 rutin이 많이 함유되어 있기 때문이다(36).

소장 점막의 α -glucosidase 활성 저해 효과

소장 점막의 α -glucosidase의 활성 저해 효과를 *in vitro*에서 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. M 환, 25SM 환, 50SM 환, 75SM 환 및 100S 환에서 각각 34.0%, 33.4%, 37.2%, 37.5% 및 36.1%로 뽕잎에 누에가루를 혼합함으로써 α -glucosidase 활성의 저해 효과가 증가되었으며, 특히 누에가루를 50% 이상 혼합한 환부터 그 정도가 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 누에가루가 α -glucosidase 활성 저해 효과가 높은 DNJ 함량이 높기 때문에 (Table 2) 당 분해효소의 작용을 억제하여 당의 흡수를 지연시킴으로써 식후 급격한 혈당상승을 방지하는 효과가 있다는 보고(21-23)와 일치한다.

혈당수준

혈중 포도당 수준을 측정하여 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 제조환 비공급 군인 DM군(582.29 ± 56.74 mg/dL)에 비하여 제조환 공급 군인 M군(452.41 ± 34.10 mg/dL), 25SM군(432.92 ± 47.26 mg/dL), 50SM군(382.37 ± 30.16 mg/dL), 75SM군(357.42 ± 32.13 mg/dL) 및 100S군(370.33 ± 36.55 mg/dL)에서 각각 DM군에 비하여 22%, 26%, 34%, 39% 및 36%씩 유의적으로 혈당량이 감소되었으며, 특히 누에가루를 50% 이상 혼합한 군들에서 혈당강하 정도가 더욱 현저하였다. 이러한 결과는 Lee(37)의 연구에서 STZ투여 고혈당 마우스

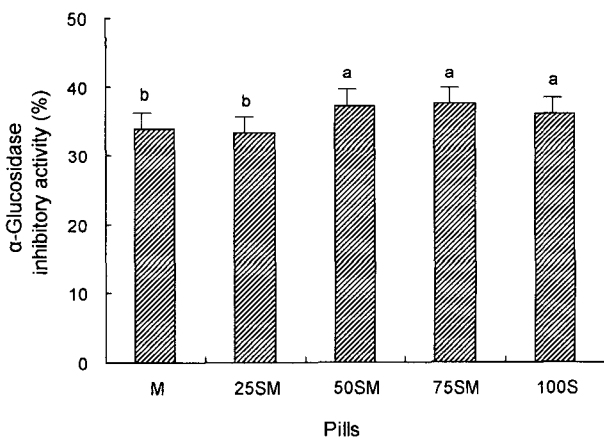


Fig. 1. Effects of pills made of mulberry leaves and silkworm powder on rat intestinal mucosa α -glucosidase inhibitory activity *in vitro*. All values are mean \pm SE ($n=10$). Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. Experimental conditions are same as Table 1.

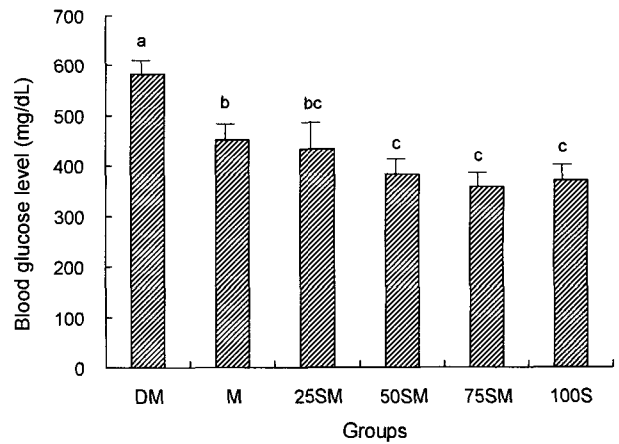


Fig. 2. Effects of pills made of mulberry leaves and silk-worm powder on blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats. All values are mean \pm SE ($n=10$). Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. Experimental conditions are same as Table 1.

에서 상엽추출물이 공복 시에 당뇨 대조군에 비하여 수층 투여군과 에탄올층 투여군에서 혈당강하 효과가 있었다는 결과와 비슷한 경향을 보였다. 이러한 혈당강하 작용은 뽕잎이나 누에가루의 DNJ 성분이 인슐린의 농도에는 영향을 주지 않으면서 α -glucosidase, α -mannosidase 및 β -galactosidase의 작용을 억제하는 효과가 있다는 Chung 등(20)의 보고에 기인하는 것으로 본다.

소장 점막의 이당류 분해효소 활성

소장을 동일하게 proximal, middle 및 distal의 세부분으로 나누어 소장 점막의 maltase, sucrase 및 lactase 등의 disaccharidase의 활성을 측정한 결과 maltase의 경우 proximal 부분에서 제조환 비공급군인 DM군에 비하여 제조환 공급군인 M군, 25SM군, 50SM군, 75SM군 및 100S군에서 각각 8.7%, 12.7%, 13.7%, 16.3% 및 21.5%씩 감소되었다. Middle 부분은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. Distal 부분에서는 DM군에 비하여 제조환 공급군에서 다소 감소되었으며, 특히 50SM군, 75SM군 및 100S군에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 3A). Sucrase의 경우 proximal 부분에서 DM군에 비하여 제조환 공급군에서 유의적으로 감소되었으며, middle 및 distal에서는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3B). Lactase의 경우에는 proximal 부분에서 DM군에 비하여 제조환 공급군에서 유의적으로 감소되었으나, middle 및 distal에서는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3C).

각 부분 간 효소활성이 높은 순서대로 비교해 본 결과 maltase의 경우 DM군은 distal > proximal \geq middle 순이었으며, 제조환 공급군에서는 distal \geq middle > proximal 순으로 높았다. Sucrase의 경우에는 DM군은 proximal \geq distal > middle 순이었고, 제조환 공급군에서는 distal > middle

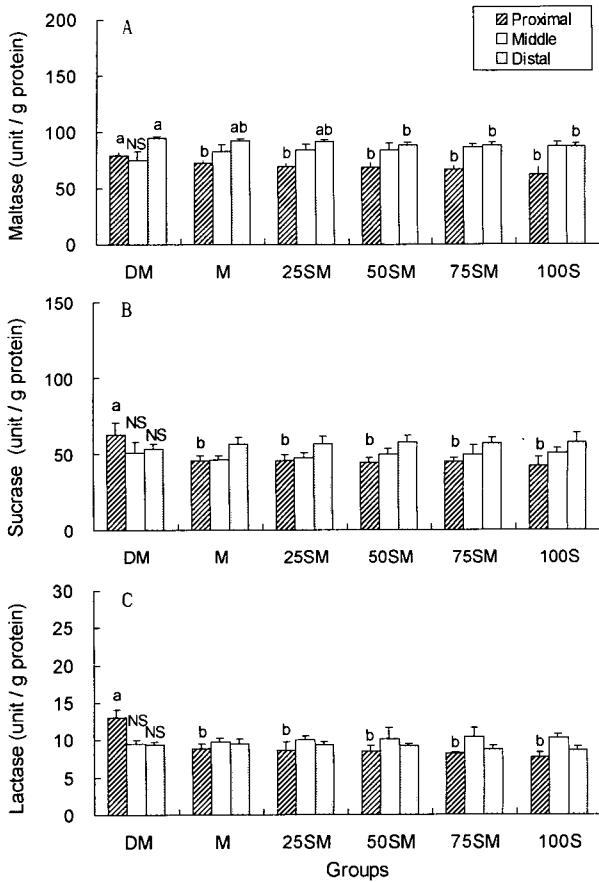


Fig. 3. Effects of pills made of mulberry leaves and silk-worm powder on intestinal mucosa maltase (A), sucrase (B) and lactase (C) activities in streptozotocin-induced diabetic rats.

All values are mean ± SE (n=10). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's test. Experimental conditions are same as Table 1.

≥ proximal 순으로 높았다. Lactase의 경우에는 DM군은 proximal > middle ≥ distal 순이었고, 제조환 공급군에서는 전반적으로 middle > distal > proximal 순으로 높은 경향이 있었다. 그 결과 뽕잎에 누에가루를 혼합한 환은 당뇨 상태에서 소장 proximal 부분의 이당류 분해효소의 활성을 저해하여 급격한 혈당상승을 억제시키는 효과가 있음을 관찰할 수 있었으며 이는 Yoo와 Rhee(38)의 선행 연구와 같은 경향이 있었다. 그리고 proximal 부분에서 억제된 이당류 분해효소의 활성은 middle 및 distal 부분에서는 활성이 점차 증가되었는데 이는 proximal 부분에서 미처 다 분해되지 못한 다당류가 소장의 뒷부분으로 가면서 천천히 분해된 것으로 본다.

이와 같이 잠상산물 가운데 뽕잎과 누에를 혼합하여 제조한 환이 뽕잎만으로 제조한 환에 비하여 *in vitro* 실험에서 뿐만 아니라 및 STZ 유발 당뇨 쥐에서 혈당강하 상승효과를 관찰할 수 있었으며 특히 뽕잎 50%와 누에가루 50%를 혼합한 50SM 환이 가장 높은 혈당강하 작용이 있음을 관찰할 수 있었다. 또 이러한 혈당강하 효과는 소장 점막의 proximal 부분의 이당류 분해효소 활성을 조절함으로써 급격한

혈당 상승을 억제시키는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 당뇨병에서 잠상산물을 이용하여 혈당강하 상승효과를 얻기 위해서는 뽕잎과 누에가루를 동량 혼합하였을 때 가장 높은 효과를 기대할 수 있으므로 이를 항당뇨 기능성 제품 제조에 응용하는 것이 가장 바람직 할 것으로 본다.

요 약

본 연구에서는 뽕잎과 누에가루의 함량 비를 달리하여 제조한 환의 혈당강하 효과를 *in vitro* 및 동물실험을 통해 검증하고자 하였다. 실험동물은 체중 100 g내외의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐를 이용하였으며, 제조환은 식이 내에 0.4%(4 g/kg)씩 공급하였다. 실험군은 제조환의 종류에 따라 제조환을 공급하지 않은 당뇨 대조군(DM group), 뽕잎 100%로 제조한 군(M group), 뽕잎에 누에가루를 각각 25%(25SM group), 50%(50SM group), 75%(75SM group) 및 100%(100S group)씩 혼합하여 제조한 군으로 나누었다. 식이와 식수는 자유섭식시켰으며, 3주 간 사육한 후 STZ로 당뇨를 유발시켰으며, 9일 만에 희생시켰다. 제조된 혼합 환의 DNJ의 함량은 누에가루의 혼합 비율이 높을수록 증가되었다. GABA 및 rutin의 함량은 뽕잎의 혼합 비율이 증가함에 따라 함량이 증가되었다. *In vitro*에서 소장 점막의 α-glucosidase의 활성저해 효과도 뽕잎에 누에가루를 50% 이상 혼합시켰을 때 혼합하지 않은 환과 25SM 환보다 유의적으로 증가되었다. 혈당강하 효과는 DM군과 M군에 비해 누에가루를 혼합한 군에서 더 높았으며 특히 50%, 75% 및 100% 혼합한 군들에서는 유의적인 혈당강하 효과를 나타내었다. 소장 점막 maltase 활성은 proximal 부분에서 DM군에 비하여 제조환 공급군 모두가 유의적으로 감소되었으며, 제조환 공급군 간에는 유의적인 차이는 없었다. Middle 부분에서는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. Distal 부분에서는 DM군에 비하여 제조환 공급군에서 감소되었으며, 특히 50SM군, 75SM군 및 100S군에서 현저하게 감소하였다. Sucrase와 lactase의 경우에는 proximal부분에서 DM군에 비하여 제조환 공급군에서 유의적으로 감소되었으며, middle 및 distal부분에서는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 결론적으로 뽕잎과 누에가루를 혼합하여 제조한 환은 *in vitro*실험에서 α-glucosidase 활성 저해효과를 증가시켰으며, STZ 유발 당뇨 쥐의 소장 proximal 부분의 이당류 분해효소 활성을 억제함으로써 급속한 혈당상승을 억제하는 효과가 있었다. 이러한 효과는 뽕잎과 누에가루를 50:50의 동량으로 혼합시켰을 때 가장 좋은 것으로 관찰되었다.

문 헌

1. National statistical office. 2002. The cause of death statistics.

2. Seo JS, Lee KS, Jang JH. 2004. Effect of dietary supplementation of β -carotene on lipid peroxide level and anti-oxidative vitamins of diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 72-77.
3. Ha AW, Kim HM. 1999. The study of lipid-peroxidation, antioxidant enzymes and the antioxidant vitamin in NIDDM patients with microvascular-diabetic complications. *Korean J Nutr* 31: 1139-1150.
4. Lee DM, Hoffman WH, Carl GF, Cornwell PE. 2002. Lipid peroxidation and antioxidant vitamin prior to during and after correction of diabetic ketoacidosis. *J Diabetes Complications* 16: 294-300.
5. Son HY, Hotta N, Sukamoto N, Natenoka S, Ohishi N, Yagi N. 1992. Lipoprotein(a) and diabetes mellitus. *J Korean Diabetes Assoc* 16: 275-280.
6. Lim SJ, Choi SS. 1997. The effect of *Tricosanthes kiliouii* Max. subfractions on the insulin activity in streptozotocin induced diabetic rats and their acute toxicity. *Korean J Nutr* 30: 25-31.
7. Lim SJ, Kim KJ. 1995. Hypoglycemic effect of *Polygonatum adoratum* var. pluriflorum ohwi extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 28: 727-736.
8. Lim SJ, Kim SY, Lee JW. 1995. The effects of korean wild vegetables on blood glucose levels and liver-muscle metabolism of streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 28: 585-594.
9. Kim MW. 2001. Effects of H₂O-fraction of *Discorea japonica* Thunb and selenium on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 17: 344-352.
10. Lee JS, Son HS, Maeng YS, Chang YK, Ju JS. 1994. Effects of buckwheat on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 27: 819-827.
11. Kim HB, Kim AJ, Kim SY. 2003. The analysis of functional materials in mulberry fruit and feed product development trends. *Food Sci and Industry* 36: 49-60.
12. Kim MS, Choue RW, Chung SH, Koo SJ. 1998. Blood glucose lowering effects of mulberry leaf and silkworm extracts on mice fed with high-carbohydrate diet. *Korean J Nutr* 31: 117-125.
13. Shin DH. 1998. Antioxidation substances in mulberry leaf. *J Korean Oil Chemists Soc* 16: 27-31.
14. Kodama T, Ishida H, Kokubo T, Yamakawa T, Noguchi H. 1990. Glucosylation of quercetin by a cell suspension culture of vitis species. *Agric Biology Chemical* 54: 3238-3288.
15. Chae JY, Lee JY, Hoang IS, Whangbo D, Choi PW, Lee WC, Kim JW, Kim SY, Choi SW, Rhee SJ. 2003. Analysis of functional components of leaf of different mulberry cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 15-21.
16. Onogi A, Osawa K, Yasuda H, Sakai A, Morita H, Tokawa H. 1993. Flavonol glycosides from the leaf of *Morus alba*. *Shoyakugaku Zasshi* 47: 423-425.
17. Shin KH, Young HS, Lee TW, Choi JS. 1995. Studies on the chemical component and antioxidative effects of *Solanum lyratum*. *Korean J Pharma* 26: 130-138.
18. Kim MW, Ahn MS, Lim YH. 2003. The antioxidative activities of mulberry leaves extracts on edible soybean oil. *Korean J Food Culture* 18: 1-8.
19. Yen GC, Wu SC, Duh PD. 1996. Extraction and identification of anti-oxidant components from the leaf of mulberry (*Morus alba* L.). *J Bio Chem* 261: 12879-12882.
20. Chung SH, Yu JH, Kim EJ, Ryu KS. 1996. Blood glucose lowering effect of silkworm. *Bull K H Pharma Sci* 24: 95-100.
21. Ji SD, Shin KH, Ahn DK, Cho SY. 2003. The mass production technology and pharmacological effect of silkworm cordyceps (*Peacilomyces tenuipes*). *Food Sci Industry* 36: 38-48.
22. Shiomi S, Habu D, Takeda T, Nishiguchi S, Kuroki T, Tanaka T, Tsuchida K, Yamagami S. 1998. Significance of peptidoglycan on patients with chronic liver disease. *Korean J Nutr* 122: 760-765.
23. Park IK, Lee JO, Lee HS, Seol KY, Ahn YJ. 1998. Cytotoxic activity of *Bombyx mori* and *Morus alba* derived materials against human tumor cell lines. *Agric Chem Biotech* 41: 187-190.
24. Ryu KS, Lee HS, Chung SH, Kang PD. 1997. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative conditions of silkworm powder. *Korean J Seric Sci* 39: 79-85.
25. Ryu KS, Kim IS, Ahn MY, Kim JW, Lee PJ. 2003. Functionality research on silkworm and sericultural products. *Food Sci Industry* 35: 15-24.
26. Huang GH, Yang GZ, Chen JY, Wu XF. 2003. Expression of a human ribonuclease inhibitor variant in *Escherichia coli* and silkworm insect cell (*Bombyx mori*). *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* 35: 960-963.
27. Kim SH, Kim KS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Park YJ, Lee HY. 1997. Comparison of glucose-lowering activity of the extracts from Kangwon-do mountain mulberry leaves (*Moli folium*) and silk worm. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 391-395.
28. Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Woo SO, Han SM, Kim JH. 2003. Studies on industrial utilization of silk protein. *Food Sci Industry* 36: 25-37.
29. Stead DA, Richards RM. 1996. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-pHase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography B* 675: 295-302.
30. Bang HS, Lee WC, Shon HR, Choi YC, Kim HB. 1998. Varietal comparison of γ -aminobutyric acid content in mulberry root bark. *Korean J Seric Sci* 40: 13-16.
31. Yun SJ, Lee WC. 1995. Studies on the utilization of pharmacologically active constituents in mulberry: 1. Varietal and seasonal variations of flavonol glycoside content in leaf. *RDA J Argic Sci* 37: 201-205.
32. Rhinehart BL, Robinson KM, Liu PS, Payne AJ, Wheatley ME, Wagner SR. 1987. Inhibition of intestinal disaccharidase and suppression of blood glucose by a new α -glucosidase inhibitor-MDL 25, 637. *J Pharma Exp Ther* 241: 915-920.
33. Kim HY. 1997. *In vitro* inhibitory on rat intestinal mucosa α -glucosidase by rice hull extract. *Korean J Food Sci Technol* 29: 601-608.
34. Dahlqvist A. 1984. Assay of intestinal disaccharidases. *Scand J Clin Lab Invest* 44: 169-172.
35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193: 265-275.
36. Cho Y, Cha SH, Sok DE. 1994. Presynaptic effects of veruculogen on gamma-aminobutyric acid (GABA) uptake and release in rat brain. *Korean Biochem J* 27: 353-356.
37. Lee WC, Kim SE, Han SJ, Yun SC. 1993. Effect of number of days after urea foliar spray on mulberry leaf components and silkworms. *Korea J Seric Sic* 35: 86-88.
38. Yoo SK, Rhee SJ. 2002. Effects of YK-209 mulberry leaf on antioxidative defense system of liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1065-1070.