

생약복합제의 Streptozotocin 유발 당뇨 및 대사성증후군 모델 동물에서의 혈당에 미치는 효과

박한석¹ · 이연실² · 최세진¹ · 김진규³ · 이윤열⁴ · 김현근⁵ · 구삼희⁵ · 구대희⁵ · 기승일⁵ · 임순성^{1,2,3*}
¹한림대학교 식품영양학과, ²한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발 센터 (RIC),
³한림대학교 천연의약연구소, ⁴한림대학교 생리학교실, ⁵쥬씨메드

Effects of Herbal Complex on Blood Glucose in Streptozotocin-induced Diabetic Rats and in Mice Model of Metabolic Syndrome

Han-Seok Park¹, Yeon Sil Lee², Se-Jin Choi¹, Jin-Kyu Kim³, Yun-Lyul Lee⁴, Hyun Gwen Kim⁵,
Sam Hoi Koo⁵, Dae Hoy Ku⁵, Seung Il Ki⁵ and Soon Sung Lim^{1,2,3*}

¹Department of Food and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

²Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

³Institute of Natural Medicine, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

⁴Department of Physiology, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

⁵C-Med Co., 1476-5 Wonju, 220-944, Korea

Abstract – This study was carried out to investigate the *in vivo* and *in vitro* inhibitory effect of a traditional herbal complex (HC) extract prepared from a mixture of four oriental herbs (*Dioscorea* Rhizoma, *Glycine soja* Sieb. et Zucc, *Bombycis corpus*, Fermented *Glycine soja*) that have been widely used for the treatment and prevention of diabetes mellitus on hyperglycemia. The water extract of HC showed potent inhibitory effect on α -glucosidase with IC₅₀ value of 1.24 mg/mL. Additionally, the ethanol extract of HC was also found to exhibit significant inhibitory effect against protein tyrosine phosphatase 1 β (PTP1 β), which is known as a major regulator of both insulin and leptin signaling. In the PTP1 β inhibitory assay, the most active *n*-hexane fraction obtained from the ethanol extract of HC, was identified as a mixture of fatty acid derivatives by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). In high-fat diet-low dose streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat, the water extract of HC improved the oral glucose intolerance as compared with rosiglitazone. HC also caused a marked decrease of body weight and fasting blood glucose and a significant improvement on glucose tolerance in metabolic syndrome mice model. These findings support that this traditional HC may be useful in the control of blood glucose in diabetes mellitus and metabolic syndrome.

Key words – Herbal Complex, Protein Tyrosine Phosphatase 1 β , Diabetes, Metabolic Syndrome

지금까지 당뇨병의 치료와 예방을 위해 전세계적으로 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 당뇨병의 유병율은 꾸준히 증가하는 추세이다. 2008년 9월 통계청이 발표한 2007년 사망 및 원인통계결과에 따르면 당뇨병으로 인한 사망자 수는 인구 10만명 당 22.9명으로 악성신맹물(암), 뇌혈관질환, 심장질환, 고의적 자해(자살)에 이어 사망원인 5위에 해당한다. 이는 1997년 사망률 6위(인구 10만 명당 18.8명)에 비하여 상승한 것으로 당뇨병으로 인한 사망률이 증

가한 것을 알 수 있다.¹⁾ 그 중 당뇨병 환자의 90% 이상을 차지하고 있는 제 2형 당뇨병은 인슐린의 작용에 문제가 있거나 혹은 인슐린 분비에 결함이 있어 발병되는 것으로 알려져 있으며 이의 치료를 위한 경구용 혈당강하제들이 개발되어 임상에 사용되고 있다.^{2,4)}

당뇨병 및 대사성증후군의 치료를 위해서는 한가지 기전이 아닌 2-3가지 기전을 같이 지니고 있는 약제의 개발이 어느 때 보다도 요구되는 실정이다. 이러한 관점에서 볼 때 다양한 성분을 지니고 있는 천연물로부터 항당뇨 치료제를 개발하는 것은 매우 긍정적인 시도가 아닐 수 없다.

*교신저자(E-mail): limss@hallym.ac.kr
(Tel): 033-248-3075

산약 (*Dioscoreae Rhizoma*)은 식욕부진, 만성설사, 당뇨, 백대하 등의 치료에 이용되는 약재로,⁵⁾ 최근에는 약리학적 연구를 통해 면역조절효과,⁶⁾ 항염효과,⁷⁾ 항암효과,⁸⁾ 항산화 효과,⁹⁾ 고혈당,¹⁰⁾ 비만,¹¹⁾ 및 지질 대사¹²⁾ 등의 활성이 알려져 있다. 또한 곤충유래생약인 백강잠 (*Bombycis corpus*)은 누에 (*Bombix mori*) 유충이 백강균 (*Beauveria bassiana*)에 감염되어 죽은 충체로서 한방에서는 경풍경련 (驚風痙攣), 풍열두통 (風熱頭痛), 인후통 (咽喉痛) 등의 치료에 응용되고 있다.¹³⁾

당뇨병 환자는 특징적으로 산화적 스트레스에 대한 감수성이 높은 것으로 보고되어 있는데,¹⁴⁾ 특히나 강원도 정선 지역에 자생하는 쥐눈이콩 (*Rhynchosia nulubilis*)은 항산화 효과가 특히 뛰어나다는 연구보고가 흥미를 끌고 있다.¹⁵⁾ 또한 청국장은 항돌연변이성,¹⁶⁾ 항암성,¹⁷⁾ 및 혈전용해능¹⁸⁾ 등이 있다. 특히 Im 등의 연구에 의하면 검정콩 청국장이 대두 청국장보다 현저하게 높은 항돌연변이 효과를 확인하였다.¹⁹⁾

본 연구에서는 위와 같이 비만, 지질대사, 항염, 항산화 등의 다양한 효능을 가지는 생약 및 식품소재 (산약, 검은콩, 백강잠, 청국가루)를 혼합하여 제조한 복합제를 고지방식이에 의한 대사성증후군 모델과 streptozotocin으로 고혈당을 유발시킨 당뇨모델 동물을 활용하여 혈당조절능과 그 기전을 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 실험재료 - 본 연구에 사용된 용매 *n*-hexane, methylene chloride, *n*-butanol, ethyl acetate는 SK케미칼(주)에서, streptozotocin, acarbose, α -glucosidase, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, sodium carbonate은 sigma-aldrich에서 각각 구입하여 사용하였다. PTP1 β drug discovery kit (AK822, BIOMOL[®] International LP, USA)는 BIOMOL에서 구입하여 사용하였다. Rosiglitazone은 일본 동북대학교 약학대학 염중생리학 교실의 Kazuo Ohuchi교수로부터 제공받아 사용하였다.

그리고, 시료로 사용한 생약복합제는 산약 (*Dioscoreae Rhizoma*), 쥐눈이콩 (*Rhynchosia nulubilis*), 백강잠 (*Bombycis corpus*), 청국장가루를 각 100 g씩을 분쇄한 후 쌀풀로 반죽하여 일반적인 환약 제조 방법을 사용하여 만든 생약복합제로 (주)씨메드 (원주, 대한민국)로부터 공급받아 사용하였다.

생약복합제의 추출물 제조 - α -Glucosidase 및 PTP1 β 의 억제 활성 평가를 위해 공급받은 생약복합제를 분쇄하여 물과 ethanol 추출을 실시하였다. 분쇄한 생약복합제 100 g에 증류수 2 L를 넣고 추출기 (MS-CM709, Korea)를 이용하여 100°C 추출하고 여과지 (Whatman No. 2)를 이용하여 필터하고 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 H₂O추출물을 -70°C에서 동결한 후 동결건조기 (PVTFD10R, ilshin lab)로 건조하

여 파우더 형태의 H₂O추출물 31.67 g (31.67%)을 얻었다. 또한, 분쇄한 생약복합제 300 g을 95% ethanol 3L에 넣고 추출기를 이용하여 70-80°C에서 환류추출하여 ethanol추출물을 얻고, 여과지 (Whatman No. 2)를 이용하여 필터하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 ethanol추출물을 감압농축한 다음, 완전히 물로 치환한 후 동결건조하여 파우더 형태의 ethanol추출물 41.92 g (13.97%)을 얻었다. 상기 방법으로 얻은 ethanol추출물을 극성별로 물질을 분획하기 위하여 용매분획을 실시하였다. 즉, ethanol추출물을 분획여두를 이용하여 노르말-헥산 : 물 (1:1 v/v)로 각 1 L씩 넣은 후, 흔들어 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 *n*-hexane추출물을 확보하고 이를 감압농축하여 *n*-hexane분획물 12.56 g (4.19%)을 얻었다. 계속해서 잔여물로 남은 수층을 대상으로 극성이 증가하는 순서로 분획물을 확보하여 methylene chloride분획물 (4.68 g, 1.56%), ethyl acetate분획물 (6.66 g, 2.22%), *n*-butanol분획물 (5.10 g, 1.7%) 및 잔여 water분획물 (12.46 g, 4.15%)을 확보하여 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

α -Glucosidase 저해활성 측정 - α -Glucosidase 저해활성 측정 방법은 김의 방법을 변형하여 실시하였다.²⁰⁾ 효소 2.1 unit를 phosphate buffer 용액 (PBS)에 녹인 2 mL용액과 시료 400 μ L 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 0.55 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 1 mL 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.1 M sodium carbonate를 1.6 mL를 가하여 반응을 종료시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \{1 - (\text{Sample O.D.} / \text{Control O.D.})\} \times 100$$

Control O.D: 시료 대신 PBS 가한 시험액의 흡광도

Sample O.D: 시료를 가한 시험액의 흡광도

Protein tyrosine phosphatase 1 β (PTP1 β) 억제활성 측정 - PTP1 β 효소활성은 PTP1 β drug discovery kit (AK822, BIOMOL[®] International LP, USA)를 사용하여 제시된 protocol의 방법으로 실시하였다. 즉, 100 mM methyl ethyl sulfide (MES) (pH 6.0)과 0.3 M NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT)과 0.1% NP-40이 포함되어 있는 완충액에 용해시킨 인산화 펩타이드 기질인 insulin receptor 5 (IR5) 75 μ M과 PTP1 β (2.5 ng/well)이 담겨있는 각 well에 시험시료를 첨가하였다. 37°C에서 30분간 반응시킨 후 발색 시약인 BIOMOL RED[™]를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \{1 - (\text{Sample O.D.} / \text{Control O.D.})\} \times 100$$

Control O.D: 시료 대신 PBS 가한 시험액의 흡광도

Sample O.D: 시료를 가한 시험액의 흡광도

PTP1 β 효소활성 성분 분석을 위한 GC-MS 조건 - 생

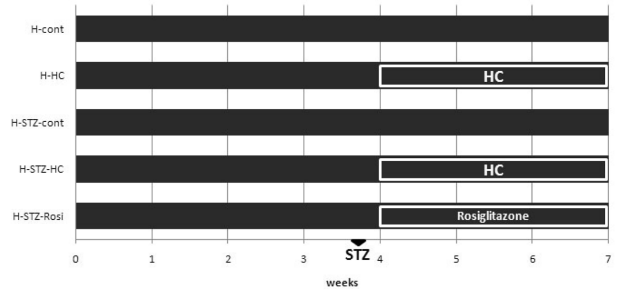
약복합제의 ethanol 추출물로부터 얻은 *n*-hexane층을 대상으로 물질의 구성을 확인하기 위하여 1차적인 방법으로 gas chromatography-mass spectrometer (GC/MS)를 이용하여 성분분석을 시도하였다. 기기는 6890N (Agilent, USA)를 사용하였고, 칼럼은 DB-5MS (60 m × 0.320 mm, 0.25 mm)를 사용하였으며, 분석 조건으로 오븐의 온도는 50°C에서 3분간 머무르고, 200°C까지 분당 10°C씩 올린 후, 다시 220°C까지 분당 5°C씩 올리고 15분간 유지하였다. Injector 온도는 250°C이었으며, 시료 1 µL를 주입하였다. Carrier gas는 He을 사용하여 0.5 ml/min으로 하였다. 검출기는 electron impact (EI)를 이용하였고, 그 조건은 ionization energy 70 eV, source temp. 250°C, trap current 300 µA로 하였으며, 각각의 total ion chromatogram을 얻은 후 NBS library에 의하여 잠정적(tentatively) 화학구조를 동정하였다.

Streptozotocin 유도 당뇨모델 동물실험 - 체중 180~200 g인 4주령 수컷 rat (Sprague Dawley)를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여, 온도 23±1°C, 습도 60±5%, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조명 150-300 lux, 조명시간 12시간 명암주기 등의 동물 사육실 환경에서 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 사육환경에 적응시켰다. 동물용 사료는 (주)중앙실험동물에서 구입한 고지방식이를 사용하였다. 1주일간 동물사육실에 적응된 동물을 Fig. 1 (A)와 같이 실험군을 분류하고, 당뇨유발 실험군은 25일째에 저용량의 streptozotocin (STZ, 35 mg/kg)를 복강투여 하여 당뇨를 유도하였다. 그리고 24시간 후 꼬리정맥으로부터 공복혈당을 측정하여 250 mg/dl 이상의 동물을 선별하여 한 군을 8마리씩으로 하였다. 시료의 섭취는 생약복합제의 H₂O추출물을 증류수에 녹여 경구투여 하였다. 투여용량은 인체 투여량을 기준으로 동물의 체중대로 환산하여 결정하였다. 즉, 인체 투여량을 체중 60 kg 성인이 1회 3 g (약 40환)씩 하루 3회 섭취 (9 g/60 kg)를 기준으로 하여 동물투여량을 가정한다면, 동물체중 kg당 150 mg을 투여하는 것이 필요하나, H₂O 추출물의 수율이 약 33%이므로 1일 50 mg/kg 을 투여하였다. 또한 rosiglitazone은 투약 지시서를 참고하여 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 실험동물의 체중은 일주일에 2회 측정하였다.

대사성증후군모델 동물실험 - 체중 20~25 g인 4주령 수컷 ICR mouse를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여, STZ 유도 당뇨모델과 같은 환경의 동물 사육실에서 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 적응시켰다. 동물용 사료는 (주)중앙실험동물에서 구입한 고지방식이를 사용하였다. 적응 후 5주 동안 고지방식이를 섭취시켜 대사성증후군을 유도하였다. 시험군의 구성은 한 군을 8마리씩으로 하였으며, Fig. 1(B)와 같다. 시료의 섭취는 고형의 사료와 환제를 분쇄하고, 이를 혼합하여 섭취토록 하였다.

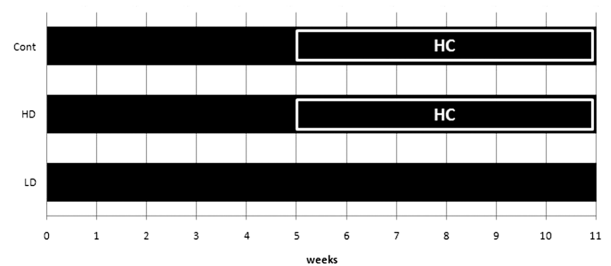
사료 kg당 저용량 (low dosage, LD) 실험군은 9 g, 고용

(A) Model of STZ-induced diabetic rat



H-Cont : High-fat diet control
 H-HC : High-fat diet + herbal complex
 H-STZ-cont : High-fat diet + streptozotocin control
 H-STZ-HC : High-fat diet + streptozotocin + herbal complex
 H-STZ-Rosi : High-fat diet + streptozotocin + rosiglitazone
 HC: Herbal complex

(B) Model of mice of metabolic syndrome



Cont : Normal control
 HD : High-fat diet + high dosage
 LD : High-fat diet + low dosage
 HC: Herbal complex

Fig. 1. Protocols of animal experiment.

량 (high dosage, HD) 실험군은 36 g의 용량으로 혼합하여 6주 동안 섭취시켰다. 동물의 체중증가량은 시료투여 일주일 시작으로 일주일에 1회 측정하였으며, 10시간 공복혈당은 주 1회 실시하였다. 시료 투여량의 결정은 체중 60 kg 성인이 1회 3 g (약 40환)씩 하루 동안 3회 섭취함을 고려하면 체중 kg당 150 mg을 섭취하는 것이 정량이며, 실험동물의 평균 몸무게 (30 g)와 사료섭취량 (5g)을 조사하여, 식이 5 g당 생약복합제 30mg을 혼합하였다. 즉, LD 그룹의 경우에는 사료 kg당 시료를 9 g 포함시켰으며, HD 그룹은 4배인 36 g을 포함시켜 사료 제작하여 섭취시켰다.

경구내당능 검사 (Oral glucose tolerance test, OGTT) - 대사성증후군 및 당뇨 모델 동물을 대상으로 OGTT 실험하였으며, 실험이 종료되는 시점에서 16시간 동안 절식 후에 실시하였다. Glucose를 2 g/kg 용량으로 경구투여하고 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min 마다 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈당측정기 (Accu check, Germany)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

조직학적 검사 - STZ 유도 당뇨 모델을 대상으로 조직검사를 하였으며, 조직학적 관찰을 위해 실험동물을 diethylether

로 마취 후 해부하여 췌장을 적출하고 4에°C서 10% paraformaldehyde에 24시간 고정하였다. 고정된 췌장을 흐르는 물에 5시간 이상 세척한 후 자동 조직 처리기 (Leica, Germany)를 이용하여 탈수하였고, 파라핀을 침투 시킨 조직을 파라핀 포매기 (EG 1150, Germany)로 파라핀 블록을 제작하였다. 마이크로톰 (Leica, Germany)을 사용하여 5 µm 두께로 절편을 제작한 후 농도 단계별 xylene과 alcohol을 이용하여 탈파라핀 및 탈수 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색 한 후 흡수시키고, 광학현미경으로 관찰하였다.

통계학적 분석 - 모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 동물실험 결과는 대조군과 비교하여 통계적 유의성을 student's *t*-test로 처리하였으며 *p*<0.05 이하인 경우 유의적인 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

α-Glucosidase 억제활성 - 식이 중의 전분과 α-결합을 하고 있는 탄수화물은 소장에서 α-glucosidase에 의해 단당류로 분해된 후 glucose 상태로 흡수되어 식후 혈당치를 증가시키므로 α-glucosidase의 효과적인 억제는 식후혈당 억제 효능의 당뇨약으로 사용되고 있다.²¹⁾

생약복합제의 H₂O추출물 및 ethanol추출물의 α-glucosidase 저해활성의 결과를 Table 1에 나타내었다. 생약복합제의 H₂O 추출물은 2.5, 1.25, 0.63 mg/mL 농도에서 α-glucosidase 활성을 각각 73.5%, 50.5%, 21.7% 저해하여 IC₅₀ 값이 1.24 mg/mL 이었으며, ethanol추출물은 동일 농도에서 60.6%, 42.3%, 16.3% 저해하여 IC₅₀ 는 1.92 mg/mL로 확인되었다. 이는 0.8, 0.4, 0.08 mg/mL 농도에서 각각 69.3%, 46.7%, 38.2%의 저해활성 (IC₅₀=0.39 mg/mL)을 보인 acarbose (현재 의약품으로 사용 중인 표준약물) 보다 H₂O추출물이 1/3 배 가량의 억제활성을 나타내었다. 복합추출물 수준에서 순

수 정제된 acarbose 효능에 1/3배 수준의 억제 효능을 가지는 것은 복합추출물 중에 α-glucosidase 를 효과적으로 억제하는 물질이 혼합되었을 것으로 판단된다. 따라서, 이 생약복합제는 *in vivo*에서도 식후 혈당의 급격한 증가를 어느 정도 예방할 수 있으리라 기대되었다. 현재 시판되고 있는 acarbose와 같은 α-glucosidase 저해제는 장기간 복용할 경우 일부 환자에 있어서 복부팽만감, 구토, 설사 등 부작용을 나타내고 있어 그 사용이 제한될 수 있다. 이에 부작용이 적은 천연물로부터 혈당강하제를 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 천연물 추출물로부터 α-glucosidase 저해제가 분리되어 보고 되고있다.²²⁾ 본 연구에서도 천연물인 생약복합제 추출물로부터 α-glucosidase의 저해활성을 확인함으로써 생약복합제의 혈당강하제로서의 가능성을 확인하였다.

PTP1β 억제활성 및 GC-MS를 이용한 활성물질의 확인
- 생약복합제의 각 추출물과 분획물들의 PTP1β 억제 활성

Table II. Inhibitory effect of PTP1β activity

	Concentration (µg/ml)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
HC H ₂ O ext.	800	10.2	-
	400	NA	
	80	NA	
HC EtOH ext.	800	64.00	498.46
	400	42.11	
	80	36.07	
HC EtOH ext.	800	68.44	444.32
	400	42.39	
	80	37.20	
MC fr.	800	44.43	951.75
	400	27.12	
	80	15.63	
EtOAc fr.	800	57.56	670.58
	400	34.08	
	80	20.33	
<i>n</i> -BuOH fr.	800	62.67	560.56
	400	41.99	
	80	23.70	
H ₂ O fr.	800	65.43	490.73
	400	41.96	
	80	35.82	
Suramin	1.0 (0.8 µM)	59.67	0.72
	0.5 (0.4 µM)	40.04	(0.57 µM)
	0.1 (0.08 µM)	34.89	

NA: Non-active

Table I. Inhibitory effect of α-glucosidase activity

	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
HC H ₂ O ext.	2.5	73.5	1.24
	1.25	50.5	
	0.63	21.7	
HC EtOH ext.	2.5	60.6	1.92
	1.25	42.3	
	0.63	16.3	
Acarbose	0.8	69.3	0.39
	0.4	46.7	
	0.4	46.7	
	0.08	38.2	

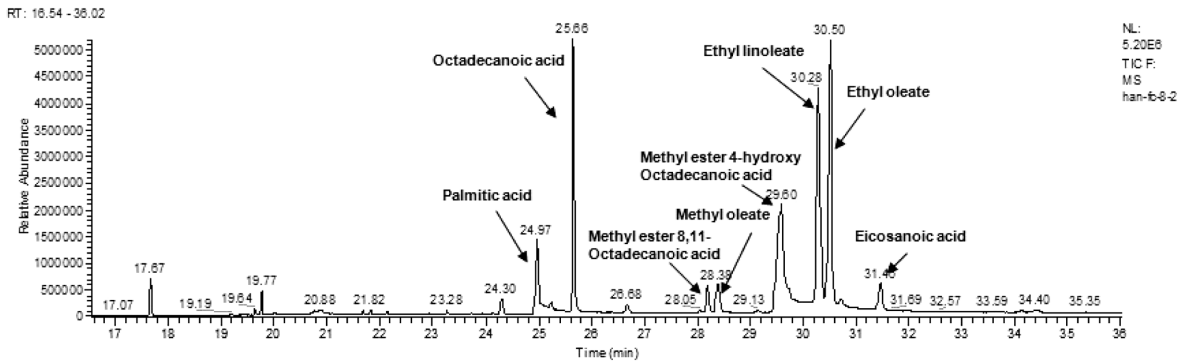


Fig. 2. GC-MS chromatogram of the *n*-hexane fraction of ethanol extract from herbal complex (HC).

Table III. Composition of *n*-hexane fraction of the ethanol extract from HC by GC-MS

No.	Retention time (min)	Compounds	Relative area (%)
1	24.97	Palmitic acid	6.21
2	25.66	Octadecanoic acid	15.52
3	28.19	Methyl ester 8,11-Octadecanoic acid	2.1
4	28.38	Methyl oleate	2.7
5	29.60	Methyl ester 4-hydroxy Octadecanoic acid	19.54
6	30.28	Ethyl linoleate	19.29
7	30.50	Ethyl oleate	23.94
8	31.46	Eicosanoic acid	2.42

결과를 Table 2에 나타내었다. 생약복합제의 H₂O추출물은 활성이 아주 낮은 수준 (800 µg/ml농도에서 10.2% 억제 활성)이었으나, ethanol 추출물은 IC₅₀값이 498.46 µg/mL 수준으로 비교약물인 suramin의 0.57 µM (0.72 µg/ml)에 비한다면 약한 면은 있으나, 추출물 수준에서는 비교적 강한 억제 활성을 보였다. 이와 같이 H₂O추출물과 ethanol추출물 간의 활성차이는 ethanol 추출물에 함유된 성분에 물로 추출되지 않는 활성물질이 함유된 것으로 판단되어 그 물질의 주체를 확인 하고자 ethanol 추출물을 대상으로 극성용매 별 분획을 실시하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 극성별로 분획을 하였음에도 불구하고, methylene chloride 분획이 비교적 약하고, 대부분의 분획에서 강한 PTP1β 억제 활성을 나타내었다. 이들 분획 중에서 가장 강한 억제 활성이 우수한 *n*-hexane 분획물 (IC₅₀ 값이 444.32 µg/mL)의 성분을 확인하기 위하여 GC-MS를 실시하였다 (Fig. 2, Table 3).

n-Hexane 분획물의 GC-MS 결과 대부분 탄소 18-22개로 이루어진 지방산 혹은 이들의 methyl, ethyl ester 형태임을 알 수 있었다.

고지방식이 및 저용량 STZ 유도 당뇨쥐의 체중증가량 및 식이효율 (food efficiency ratio, FER) – 고지방식을 병용한 저용량 STZ으로 유발시킨 당뇨동물모델의 체중변화를 Fig. 3에 나타내었다. 실험 3주차까지는 모든 군에서 체중증가 속도가 유사한 것을 볼 수 있었다. 정상대조군은 실험종료일까지 꾸준히 체중이 증가한 반면, 당뇨실험군에서는 STZ 투여 후부터 감소하는 경향을 보였다. 그러나, 각 당뇨실험군 간에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

식이효율에 있어 정상대조군의 경우 0.26으로 가장 좋은 효율이 관찰됐다. 당뇨유발군 중에서 생약복합제를 섭취시킨 동물군은 식이효율이 0.12로 당뇨대조군의 0.14과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지는 않았다 (Table 4).

일반적으로 제1형 당뇨병 환자들은 병이 만성적이거나 병증이 심하면 체중이 감소된다고 알려져 있으며, STZ에 의해 유발된 당뇨쥐는 췌장 베타 세포의 파괴로 인한 인슐린

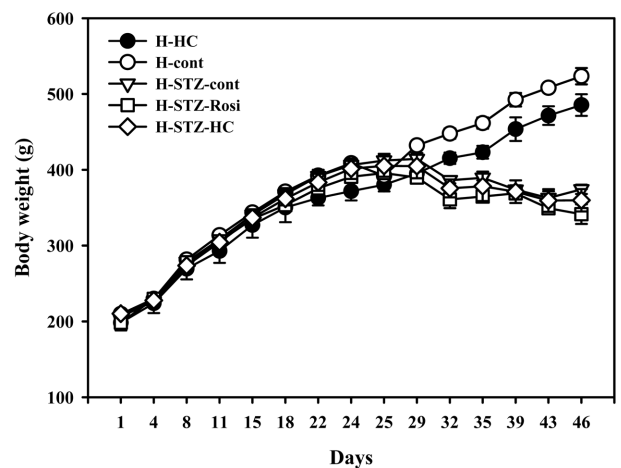


Fig. 3. Changes of body weight in STZ-induced diabetic rat. HC: Herbal complex, H-cont: High-fat diet control, H-HC: High-fat diet + herbal complex, H-STZ-cont: High-fat diet + streptozotocin control, H-STZ-HC: High-fat diet + streptozotocin + herbal complex, H-STZ-Rosi: High-fat diet + streptozotocin + rosiglitazone.

Table IV. Body weight, food intakes and food efficiency ratio (FER) in STZ-induced diabetic rats.

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Change of body weight (g)	Food intake (g)	FER
H-cont	209.7±2.2	523.5±22.0	313.8±12.6	1227	0.26
H-HC	198.3±10.2	485.5±14.2	287.2±15.2	1244	0.23
H-STZ-cont	202.9±1.2	371.9±1.2	169.0±0.4	1207	0.14
H-STZ-Rosi	195.3±1.0	340.4±3.3**	145.1±2.9**	1319	0.11
H-STZ-HC	209.0±0.7	358.2±2.5**	149.2±1.3**	1252	0.12

Values are represent the mean±SD (n=8). ***p*<0.01 compared to diabetic (STZ) control. H-cont: High-fat diet control, H-HC: High-fat diet + herbal complex, H-STZ-cont: High-fat diet + streptozotocin control, H-STZ-HC: High-fat diet + streptozotocin + herbal complex, H-STZ-Rosi: High-fat diet + streptozotocin + rosiglitazone, HC: Herbal complex

생성 장애를 일으켜 세포 내 포도당 이용률이 감소되면서 간, 근육, 지방조직 내에 있는 지방과 단백질이 부족한 에너지를 생산하는데 소모되어 체중이 쉽게 회복되지 않기 때

문이다.²³⁾ 따라서 본 연구에서 STZ에 의해 유발된 당뇨병 모델의 체중 감소는 당뇨병 유발에 따른 대사 불균형에 기인하는 것으로 사료된다.

고지방식이 및 저용량 STZ 유도 당뇨쥐의 경구당부하능 검사 (OGTT) - 생약복합제를 섭취시킨 동물에서 경구내당능 정도를 확인하기 위해 oral glucose tolerance test (OGTT)를 실시하였다 (Fig. 4, Table 5). Glucose투여 후 30분에서 60분 사이에 모든 실험군에서 최고치의 혈당수치를 보였다. 정상식이 실험군의 경우 생약복합제 섭취군에서 섭취하지 않은 군과 비교하여 glucose 투여 30분에서 낮은 혈당수준을 보였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 또한, STZ 당뇨모델군에서 대조군의 경우 glucose 투여 후 30분과 60분에 각각 495.0±10.6 mg/dL와 494.3±1.2 mg/dL로 급격히 상승하였다가 120분에 382.2±12.3 mg/dL로 내려오는 것을 확인 할 수 있었다. 현재 인슐린 감수성을 개선하는 것으로 알려진 제 2형 당뇨치료약인 rosiglitazone을 투여한 군의 경우는 glucose 투여 후 30분과 60분에 436.2±28.9 mg/dL와 442.8±10.84 mg/dL로 평균적으로 약 60 mg/dL정도의 혈당증가 억제 효능을 가지는 것으로 확인되었으며, 이는 rosiglitazone의 인슐린 감수성 개선을 통한 당부하개선 기능과 일치하는 결과이다.²⁴⁾ 또한, 생약복합제를 투여한 군에서는 30분과 60분에 463.5±5.5 mg/dL, 456.1±21.1 mg/dL로 당뇨대조군에 비하여 평균적으로 약30-40 mg/dL정도의 혈

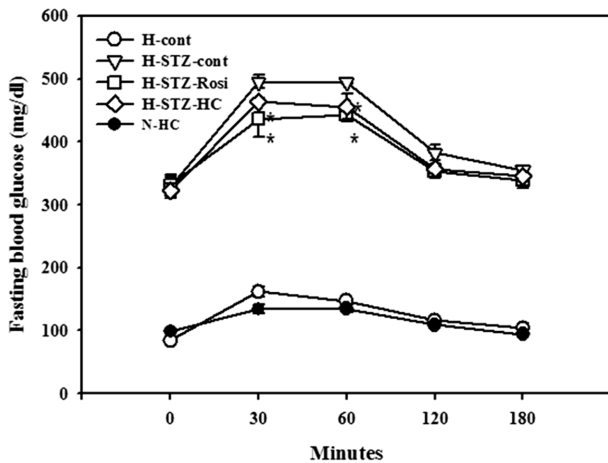


Fig. 4. Changes in blood glucose levels during OGTT in STZ-induced diabetic rat.

HC: Herbal complex, H-cont: High-fat diet control, H-HC: High-fat diet + herbal complex, H-STZ-cont: High-fat diet + streptozotocin control, H-STZ-HC: High-fat diet + streptozotocin + herbal complex, H-STZ-Rosi: High-fat diet + streptozotocin + rosiglitazone.

Table V. Changes in blood glucose levels during OGTT in STZ-induced diabetic rat (mg/dL)

Group	Time (min.)				
	0	30	60	120	180
H-cont	84.3±1.9	161.67±7.5	147.0±2.5	115.67±4.4	104.0±7.0
H-HC	94.2±3.2	139.6±7.2	137.2±6.4	107.8±3.00	106.01±2.9
H-STZ-cont	328.7±14.8	495.0±10.6	494.3±1.2	382.2±12.3	354.3±1.8
H-STZ-Rosi	331.4±15.7	436.2±28.9*	442.8±10.8*	353.3±11.8	339.1±12.1
H-STZ-HC	322.0±11.2	463.5±5.5*	456.1±21.1*	357.9±12.8	345.5±5.5

Values are represent the mean±SD (n=8). ***p*<0.01 compared to diabetic (STZ) control. H-cont: High-fat diet control, H-HC: High-fat diet + herbal complex, H-STZ-cont: High-fat diet + streptozotocin control, H-STZ-HC: High-fat diet + streptozotocin + herbal complex, H-STZ-Rosi: High-fat diet + streptozotocin + rosiglitazone, HC: Herbal complex

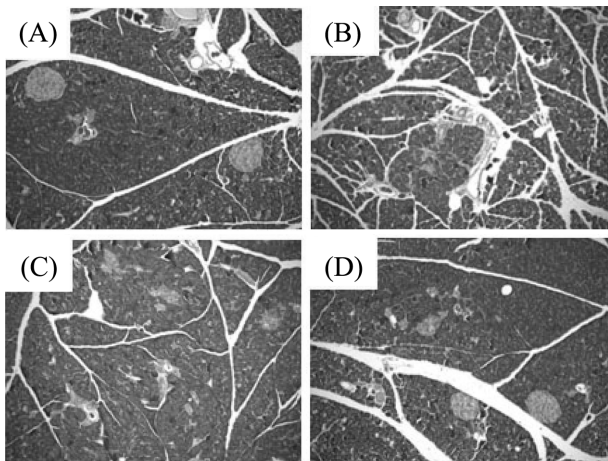


Fig. 5. Morphology of pancreas. Hematoxylin and eosin-stained paraffin sections of pancreas from high-fat diet control (A), high-fat diet + streptozotocin control (B), high-fat diet + streptozotocin + herbal complex (C) and high-fat diet + streptozotocin + rosiglitazone (D) treated rat. Magnification of histological section $\times 200$

당증가 억제 효능을 가지는 것으로 확인되었다. 이는 생약 복합제의 PTP1 β 효소를 효과적으로 억제하는 등의 기능에 의하여 인슐린 작용 기능의 개선에 의한 당부하능에 대한 기능개선 효능이라고 판단된다.

고지방식이 및 저용량 STZ 유도 당뇨쥐의 조직학적 검사 - 췌장에 대한 조직병리학적 검사 결과, 시료나 약물을 투여하지 않은 동물군은 랑겔한스 섬의 상태가 심각하게 파괴되어 있었고, rosiglitazone을 투여한 동물은 비교적 원형 모습을 유지하고 있었다. 그러나, 생약복합제를 투여한 동물군에서는 췌장의 랑겔한스 섬의 형태가 당뇨대조군과 큰 차이를 보이지 않아, 병변이 호전되었다고 판단하기에는 미흡하였다 (Fig. 5).

대사성증후군 모델의 체중 및 혈당 변화량, 식이효율 - 고지방식으로 대사성증후군을 유발시킨 mice의 실험기간동안 체중 및 혈당의 변화량은 Fig. 6에, 식이효율은 Table 6에 나타내었다. 체중변화에 대해서는 개체간 편차는 있었으나 모든 실험군에서 꾸준한 체중 증가가 관찰되었다. 시료 섭취군의 체중증가량은 대조군에 비해 낮게 나타났으나 HD와 LD군 간 섭취량에 따른 유의적 차이는 없었다.

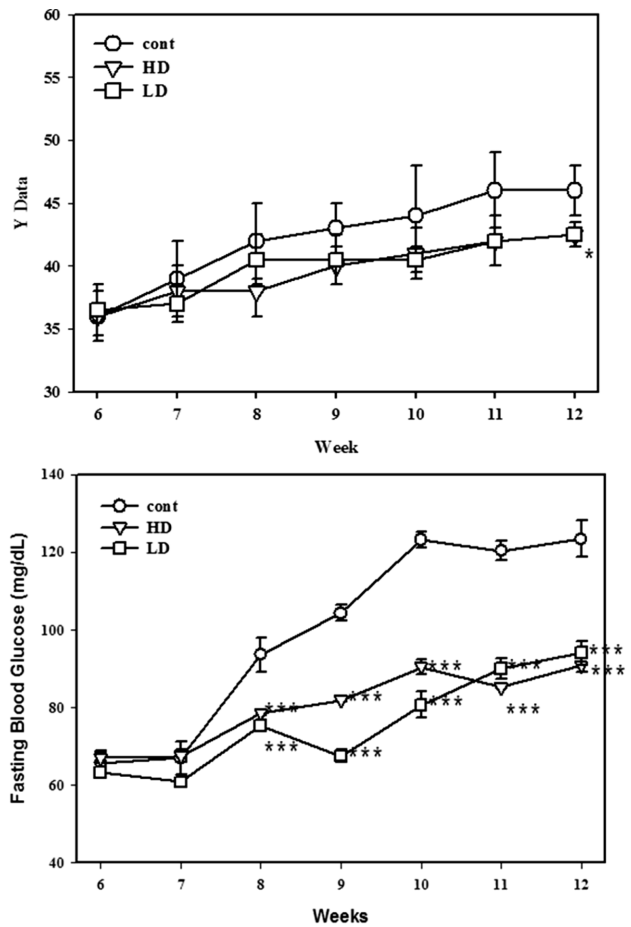


Fig. 6. Changes of body weight and fasting blood glucose level in high-fat diet induced metabolic syndrome mice. Values are represent the mean \pm SD ($n=8$). * $p<0.05$ and *** $p<0.001$ compared to high-fat diet control.

혈당 변화에서는 대조군의 경우 고지방식이 섭취 8주 경과 후 현저한 공복 혈당 상승을 관찰 할 수 있었으나, HD군과 LD군은 공복혈당 상승 폭을 줄이는 효과를 보였다. 그러나 두 시료투여군 사이에 유의적인 차이는 없었다. 이는 실험 종료 12주차까지 지속되는 것으로 확인되었다.

대사성증후군 모델의 경구당부하능 검사 (OGTT) - 대사성증후군 모델에서 생약복합제를 투여한 동물에서 내당능 정도를 확인하기 위해서 OGTT를 실시하였다 (Fig. 7, Table 7). 실험동물에 2 g/kg 용량으로 glucose을 투여한 후 시간

Table VI. Body weight, food intakes and food efficiency ratio (FER) in mice of metabolic syndrome

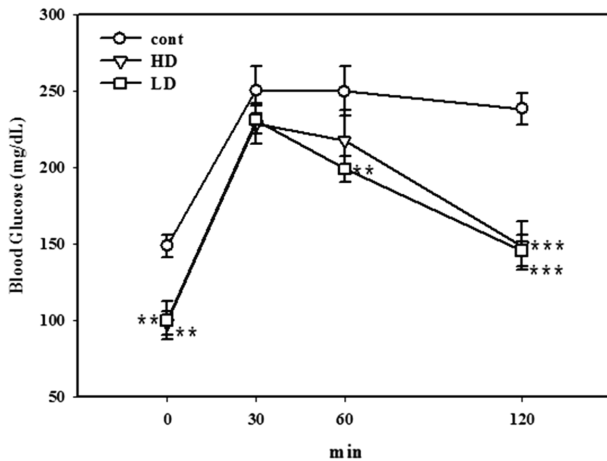
Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Change of body weight (g)	Food intake (g)	FER
High-fat diet control	36.3 \pm 1.4	46.3 \pm 1.8	10.0 \pm 1.7	252	0.04
High dosage	36.2 \pm 0.3	42.5 \pm 0.7	6.2 \pm 0.3**	235	0.03
Low dosage	36.5 \pm 0.4	42.5 \pm 1.2	6.1 \pm 0.5**	243	0.03

Values are represent the mean \pm SD ($n=8$). ** $p<0.01$ compared to diabetic control.

Table VII. Changes in blood glucose levels during OGTT in mice of metabolic syndrome (mg/dL)

Group	Time (min.)			
	0	30	60	120
High-fat diet control	150.2±7.3	251.3±15.7	248.7±16.3	237.6±10.3
High dosage	98.2±7.7**	228.3±13.3	217.2±20.0	148.6±15.7***
Low dosage	99.9±12.3**	231.0±9.0	198.7±8.5**	145.3±10.3***

Values are represent the mean±SD (n=8). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to high-fat diet control.

**Fig. 7.** Changes in blood glucose levels during OGTT in metabolic syndrome mice.

Values are represent the mean±SD (n=8). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to high-fat diet control.

에 따른 혈당 변화를 살펴보았다. 실험군 간의 초기혈당 수치가 차이가 나타나는 것을 볼 수 있었으며 glucose 투여 후 30분의 경우에는 그 차이가 없었고, 60분에서와 특히 후반부인 120분의 경우는 생약복합제 투여군과 비투여군 간의 현격한 차이를 관찰할 수 있었으나 생약복합제의 HD군과 LD군 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 생약복합제의 당대사 능력의 개선에 의한 혈당 감소 효과라 판단된다. 앞에서 실험한 고지방식이 및 STZ 유도 당뇨쥐의 OGTT결과에서는 대조군의 glucose 투여 후 30분 혈당이 495 mg/dL 수준으로 높아져 있어서 시료 및 약물투여군이 초기 30분과 60분에서 뚜렷하게 나타났으나, 대사성 증후군 모델에서는 60분 및 120분 등 후반부에서 효능이 나타나는 이유는 대사성 증후군 모델에서는 동물의 상태가 아직 초기 당뇨의 형태로 고혈당의 유발 (대조군 glucose 투여 후 30분 혈당이 250 mg/dL 수준)이 덜되어 초기에 효능이 나타나는 것이 덜 관찰 되었을 것으로 판단되었다.

식후 고혈당증은 중증의 당뇨병뿐만 아니라, 공복 시에는 고혈당 등이 나타나지 않는 경미한 당뇨병에서도 관찰되는 증상으로 알려져 있다.²⁵⁾ 식후 고혈당은 인슐린 민감도를 감소시키고 췌장 기능을 저하시켜 인슐린의 분비를 감소시키

므로 당뇨병의 상태를 악화시키고, 대혈관 합병증 및 미세혈관 합병증을 일으킨다고 보고되었다.²⁶⁾ 당뇨병 예방 및 치료에 있어서 식후 혈당을 정상치에 가깝게 조절하는 것이 중요한데, 본 연구의 실험 결과 생약복합제는 당뇨병에 의한 식후고혈당을 개선 할 수 있는 유용한 소재가 될 것으로 기대된다.

결과적으로 본 연구에서의 생약복합제는 α -glucosidase 및 PTP1 β 의 강한 억제효과를 나타내지는 않았지만, 각종 생약제로부터 유래된 화합물들이 여러 가지 혈당을 조절하는 메커니즘 중에서 α -glucosidase 및 PTP1 β 의 억제 효능이 여러 가지 원인 중에 하나로 작용하여 대사성증후군 및 당뇨병 환자들에게 도움을 줄 수 있다는 것을 확인하게 되었다. 앞으로 본 연구에 사용된 생약복합제의 각 성분과 그 기능성에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 판단 된다.

요 약

당뇨병 치료 및 예방에 전통적으로 사용되어온 생약 및 식품 소재로 구성된 생약복합제인 백강잠, 산약, 쥐눈이콩, 청국장가루의 복합물을 대상으로 실험관 및 동물실험을 통하여 혈당강하 효과를 확인하였다. 생약복합제 H₂O추출물은 당흡수에 관여하는 α -glucosidase 효소를 비교약물인 acarbose (IC₅₀=0.39 mg/mL)과 비교하여 1/3배 정도의 활성을 보였으며 (IC₅₀=1.24 mg/mL), ethano추출물은 인슐린 내성에 관여하는 PTP1 β 효소작용을 (IC₅₀=498.46 μ g/mL) 효과적으로 억제하였다. PTP1 β 효소를 억제하는 *n*-hexane 분획을 대상으로 하여 GC-MS로 성분 분석한 결과 지방산유도체인 것으로 나타났다. 고지방식사와 저용량 STZ (35 mg/kg)으로 유발시킨 당뇨모델에서 OGTT 실험결과 비교약물인 rosiglitazone(당부하 30분 후 평균 60 mg/dL의 감소)과 생약복합제 투여군의 경구 당부하능 개선효과를(당부하 30분 후 평균 30 mg/dL의 감소) 확인하였다. 또한, 대사성 증후군 모델에서는 체중증가의 감소 효과와 공복혈당의 증가를 현저히 억제함을 확인하였으며, OGTT에서도 후반부에 현저한 경구당부하능 개선 효과를 관찰 할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 산약, 백강잠, 쥐눈이콩, 청국장으로 조제한 생약복합제는 당뇨 및 대사성 증후군의 혈당을 조절하는 데 도움을 줄 수 있을 것이라 판단된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 기초과학진흥기금 (MOEHRD, KRF-2007-412-J00503)과 ㈜씨메드의 연구비 지원으로 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 통계청 (2008) 2007년 사망 및 사망원인통계결과. 8-9.
- American Diabetes Association. (2001) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. **26**: s5-s20.
- Cavaghan, M. K., Ehrmann, D. A. and Polonsky, K. S. (2000) Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* **106**: 329-333.
- Inzucchi, S. E. (2002) Oral hypoglycemic therapy for type 2 diabetes. *J. Am. Med. Assoc.* **287**: 360-372.
- 박종희, 이정규. (2000) 상용약용식물도감, 신일상사, 106.
- Choi, E. M., Koo, S. J. and Hwang, J. K. (2004) Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol.* **91**: 1-6.
- Kim, M. J., Kim, H. N., Kang, K. S., Baek, N. I., Kim, D. K., Kim, Y. S., Kim, S. H. and Jean, B. J. (2004) Methanol extract of *Dioscorea Rhizoma* inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Intern. Immunopharmacol.* **4**: 1489-1497.
- Hu, K. and Yao, X. (2003) The cytotoxicity of methyl protoneogracillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells *in vitro*. *Phytother. Res.* **17**: 620-626.
- Hou, W. C., Lee, M. H., Chen, H. J., Liang, W. L., Han, C. H., Liu, Y. W. and Lin, Y. H. (2001) Antioxidant activities of dioscorins, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne). *J. Agric. Food. Chem.* **49**: 4956-4960.
- McAnuff, M. A., Harding, W. W., Omoruyi, F. O., Jacobs, H., Morrison, E. Y. and Asemota, H. N. (2005) Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. *Food Chem. Toxicol.* **43**: 1667-1672.
- Kwon, C. S., Sohn, H. Y., Kim, S. H., Kim, J. H., Son, K. H., Lee, J. S., Lim, J. K. and Kim, J. S. (2003) Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1451-1456.
- Chen, H. L., Wang, C. H., Chang, C. T. and Wang, T. C. (2003) Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb va. *Pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition.* **19**: 646-651.
- Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Public Health, P.R. China. (1995) A coloured atlas of the Chinese material medica specified in pharmacopoeia of the people's republic of China. Guangdong science & technology press. 482.
- Abrams, J. J., Ginberg, H. and Grundy, S. M. (1982) Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in non-ketotic diabetes mellitus. *Diabetes.* **31**: 903-910.
- Sa, J. H., Shin, I. C., Jeong, K. J. and Shin T. H. (2003) Antioxidative activity and chemical characteristics from different organs of small black soybean (Yak-Kong) grown in the area of Jungsun. *Korean J. food Sci. Technol.* **35**: 309-315.
- Yoon, K. D., Kwon, D. J., Hong, S. S., Kim, S. I. and Chung, K. S. (1996) Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 525-528.
- Chung, K. S., Yoon, K. D., Dwon, D. J., Hong S. S. and Choi, S. Y. (1997) Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT Assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 477-482.
- Kil, J. O., Kim, G. N. and Park, I. S. (1998) Production and characterization of fibrinolytic enzyme: Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP - 6408 isolated from Chungkook - jang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 51-56.
- Im, C. M., Kwon, S. H., Bae, M. S., Jung, K. O., Moon, S. H. and Park, K. Y. (2006) Characteristics and increased anti-mutagenic effect of black soybean (Var. Seoritae) chungkukjang. *Cancer Prev. Res.* **11**: 218-224.
- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y. and Rhee, H. I. (2005) Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition.* **21**: 756-761.
- Godbout, A. and Chiasson, J. L. (2007) Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors? *Curr. Diab. Rep.* **7**: 333-339.
- Matsui, T., Ogunwande, I. A., Abesundara, K. J. and Matsumoto, K. (2006) Anti-hyperglycemic Potential of natural products. *Mini. Rev. Med. Chem.* **6**: 349-356.
- Pain, V. M. and Garlick, P. J. (1974) Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in issues of the rat *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **249**: 4510-4514.
- Miyazaki, Y. I., Glass L., Triplitt, C., Matsuda, M., Cusi, K., Mahankali, A., Mahankali, S., Mandarino, L. J. and DeFronzo, R. A. (2001) Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients. *Diabetologia.* **44**: 2210-2219.
- DeFronzo, R. A. (1981) The effect of insulin on renal sodium metabolism. *Diabetologia.* **21**: 165-171.
- Young, I. R. and Stout, R. W. (1987) Effects of insulin and glucose on the cells of the arterial wall: Interaction of insulin with dibutyl cyclic AMP and low density lipoprotein in arterial cells. *Diabetes Metab.* **13**: 301-306.

(2009년 8월 4일 접수)