

고지방식이급여 마우스에서 잠상산물의 항당뇨 효능

안은영 · 최상원 · 김은정

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Anti-Diabetic Effect of Sericultural Product in High Fat Diet-Fed Mice

Eunyeong Ahn, Sang-Won Choi, and Eunjung Kim

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu

ABSTRACT The objective of this study was to identify and compare the anti-diabetic effects of mulberry leave (ML), silkworm (SK), mulberry fruit (MF), and *Cudrania tricuspidata* BUREAU (CT) extracts in high fat diet (HFD)-induced obese and diabetic mice. C57BL/6N mice were assigned to six groups: normal diet (ND, n=7), HFD (n=10), HFD with 5% ML powder (ML, n=10), HFD with 2% SK powder (SK, n=10), HFD with 5% MF powder (MF, n=10), and HFD with 5% CT powder (CT, n=10). Mice were fed their assigned diet for 14 weeks. ML group showed significant reduction in levels of plasma glucose and insulin compared with the HFD group. Plasma total cholesterol (T-C) was significantly reduced by ML and SK compared with the HFD group. Plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and HTR (HDL-C to T-C ratio) levels of the ML, SK, MF, and CT groups were significantly elevated compared to the HFD group. Moreover, concentrations of hepatic T-C and triglycerides in the ML, SK, MF, and CT groups were significantly reduced in comparison to the HFD group. Levels of pAKT, pS6K, and pAMPK significantly increased in the ML group compared with the HFD group. Taken together, ML appears to be the most potent anti-diabetic and anti-dyslipidemic substance among sericultural products. ML could be developed as a potential agent for diabetes and its complication management.

Key words: type 2 diabetes, mulberry leave, silkworm, high fat diet, mouse

서 론

당뇨병은 전 세계적으로 증가하는 추세에 있으며, 우리나라에서도 최근 서구화된 식생활과 운동 부족으로 인하여 당뇨병의 발병률이 점차 증가하고 있다. 2014년 통계청의 국민건강영양조사에 따르면 당뇨병 유병률이 2005년에는 9.1%였으나, 2014년에는 10.2%로 10년 사이 1.1% 증가하였다(1). 전체 당뇨 환자의 90%를 차지하는 제2형 당뇨는 인슐린 수용체의 저항성이 증가하거나 인슐린 민감도가 떨어져서 생기는 병으로 유전적 요인도 있지만, 연령 증가, 비만도 증가, 육체활동 감소 등 많은 환경적 요인과 합쳐져 발병되는 것으로 알려져 있다(2). 특히 비만은 제2형 당뇨와 밀접한 관계를 보이는데, 비만 환자는 인슐린 저항성이 증가함에 따라 췌장 β 세포의 인슐린 분비능이 보상기전으로 증가하여 혈당을 유지한다. 그러나 인슐린 저항성의 증가 정도를 췌장 β 세포의 인슐린 분비 능력이 따라가지 못하게 되면 인슐린이 상대적으로 부족하게 되어 고혈당 상태가 되면서

당뇨가 발병하게 된다. 당뇨병은 질병 그 자체보다 합병증으로 인한 문제가 큰데, 당뇨병은 당 대사 관련 장애뿐만 아니라 지질 대사에도 이상을 초래하여 심혈관계 합병증의 위험을 증가시키게 된다. 당뇨병이 발병하는 이유는 다양하므로 각각의 병인에 근거한 새로운 약물의 개발을 위해 많은 연구가 진행되고 있으며, 합병증을 개선할 수 있는 약물 또한 활발히 연구되고 있다(3). 그러나 지금까지 개발된 약물들은 저혈당증, 인슐린 분비능 상실, 위장장애, 신장독성, 설사와 배탈, 심부전, 빈혈, 간부전 등의 부작용이 보고되어 왔다(4). 또한, 일부 약물은 심각한 간독성 및 심혈관계 부작용으로 사용이 금지된 경우도 있다. 따라서 최근에는 신물질의 개발보다는 부작용이 적은 천연물 유래 치료제의 개발이 활발히 이루어지고 있으며(3), 단독 혹은 약물을 도와 당뇨의 증상을 낮추는 천연물 유래 신약 또는 건강기능성 식품의 개발이 필요한 실정이다.

잠상산물은 뽕나무와 관련된 산물을 말하며 누에(silk-worm, SK), 오디(mulberry fruit, MF), 뽕잎(mulberry leaf, ML), 상지, 상백피 등이 있다. 본초강목과 동양의약서에 잠상산물은 당뇨를 비롯한 고혈압, 동맥경화 및 관절염 치료에 효과가 있다고 알려져 있다(5). 잠상산물의 다양한 생리적 효능은 *in vivo* 동물실험에서도 보고되었는데, 뽕잎은 혈당 강하(6,7), 소장 이당류분해 효소 활성 감소(7), 인

Received 18 October 2016; Accepted 7 February 2017

Corresponding author: Eunjung Kim, Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 38430, Korea

E-mail: kimeunj@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3523

술린 농도 감소(6), 항산화 효과(8), 혈중 지질농도 개선(9)이 보고된 바 있다. 누에(7), 오디(10,11) 및 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata* BUREAU, CT)(12)은 혈당 강하, 지질농도 개선 효과가 보고되었으며, 꾸지뽕은 인슐린 저항성 감소 및 염증 감소 효과(13)도 있음이 알려져 있다.

한편 이러한 잠상산물의 항당뇨 효능은 streptozotocin (STZ)으로 유도한 제1형 당뇨병 모델 또는 고탄수화물식과 고지방식의 급여와 함께 낮은 농도의 STZ를 투여한 제2형 당뇨병 모델에서 주로 연구되었다. 그러나 고지방식으로 유도된 제2형 당뇨병 모델에서 다양한 잠상산물 간의 항당뇨 효능을 비교한 연구는 거의 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 고지방식에 뽕잎, 누에, 오디, 꾸지뽕 분말을 첨가한 식이를 마우스에 급여했을 때 고지방식에 의해 유도되는 제2형 당뇨병의 임상적 지표 및 인슐린 신호전달 체계에 미치는 영향을 분석하고자 시행되었다.

재료 및 방법

시료 채취 및 실험재료

본 연구에 사용한 뽕나무 열매 오디와 꾸지뽕 열매는 2014년 6월 및 10월 경북 영천과 경남 밀양에서 각각 노지 재배한 것을 수확 후 곧바로 동결건조기(PVTFD-20R, Ilshinbiobase, Dongducheon, Korea)에서 건조한 것을 사

용하였으며, 뽕잎은 2014년 6월에 수확하여 곧바로 50°C 이하 열풍건조기(COBP-15S, Shinheung, Seoul, Korea)에서 건조한 것을, 그리고 누에는 같은 해 6월 뽕잎으로 키운 5령 3일째 누에를 동결건조한 것을 각각 공시재료로 사용하였다.

실험동물 및 실험식이

실험동물은 4주령 수컷 C57BL/6N 마우스 57마리를 오리엔트 바이오사(Busan, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 12시간 명암주기를 유지하고, 항온(25±2°C), 항습(50±5%) 환경에서 사육하였다. 마우스는 1주 동안 고형사료를 급여하여 실험환경에 적응시킨 후 난괴법(randomized complete block design)에 따라 다음과 같이 6군으로 분류하였다: 정상 식이를 공급한 정상식이군(normal diet, ND, n=7); 고지방 식이를 공급한 고지방식이군(high fat diet, HFD, n=10); HFD에 5% ML분말을 혼합한 식이급여군(ML, n=10); HFD에 2% SK분말을 혼합한 식이급여군(SK, n=10); HFD에 5% MF분말을 혼합한 식이급여군(MF, n=10); HFD에 5% CT분말을 혼합한 식이급여군(CT, n=10). SK분말을 다른 잠상산물 분말과 달리 식이에 2%로 혼합한 이유는 본 연구의 예비실험 결과 SK분말을 5%로 혼합하였을 때 실험식이 섭취량이 다른 실험식보다 현저히 낮아 본 실험에서는 2%로 낮추어 혼합하였다. 실험

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients	Groups ¹⁾					
	ND	HFD	ML	SK	MF	CT
Sucrose	500	370	370	370	337	334
Casein	200	200	188	189	190.5	197
Lard	0	170	170	170	170	170
Corn starch	150	111	88.5	109	111	111
Cellulose	50	50	45.2	50	46.4	47
Mineral mix ²⁾	35	42	42	42	42	42
Corn oil	50	30	28.7	28.2	28.9	29.1
Vitamin mix ³⁾	10	12	12	12	12	12
Cholesterol	0	10	10	10	10	10
D,L-Methionine	3	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2	2	2	2	2	2
t-BHQ ⁴⁾	0.01	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Mulberry leaves			50			
Silkworm				20		
Mulberry fruit					50	
<i>Cudrania tricuspidata</i> BUREAU						50
Total	1,000	1,000	1,009	1,005	1,003	1,007

¹⁾ND, normal diet; HFD, high fat diet; ML, 5% mulberry leave added in high fat diet; SK, 2% silkworm added in high fat diet; MF, 5% mulberry fruit added in high fat diet; CT, 5% *Cudrania tricuspidata* BUREAU added in high fat diet.

²⁾Composition of AIN-76 mineral mix (g/kg): calcium phosphate, dibasic 500; sodium chloride 74; potassium citrate, monohydrate 220; potassium sulfate 52; magnesium oxide 24; manganese carbonate (43~48% Mn) 3.5; ferric citrate (16~17% Fe) 6; zinc carbonate (70% ZnO) 1.6; cupric carbonate (53~55% Cu) 0.3; potassium iodate 0.01; sodium selenite 0.01; chromium potassium sulfate 0.55; sucrose, finely powdered 118.03.

³⁾Composition of AIN-76 vitamin mix (g/kg): thiamin hydrochloride 0.6; riboflavin 0.6; pyridoxine hydrochloride 0.7; nicotinic acid 3; D-calcium pantothenate 1.6; folic acid 0.2; D-biotin 0.02; cyanocobalamin 0.001; cholecalciferol (400,000 IU/g) 0.25; menaquinone 0.005; ascorbic acid 0.2; sucrose, finely powdered 992.824.

⁴⁾t-BHQ: tert-butylhydroquinone.

식은 AIN-76A diet에 기초하여 Table 1과 같이 제조하였으며 총 14주간 급여하였다. 실험기간에 식이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 식이 섭취량은 실험기간 동안 매일, 그리고 체중은 주 1회 일정 시각에 측정하였다. 식이 섭취량은 식이 공급량에서 잔량을 감하여 계산하였고, 식이 효율은 체중증가량(g/d)/식이 섭취량(g/d)으로 계산하였다. 본 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회에서 승인(승인번호 제IACUC-2015-022호)한 절차에 따라 수행하였다.

혈장 및 장기 채취

희생 전 12시간 절식 후 실험동물은 CO₂로 마취하여 개복하고 복부 대정맥으로부터 헤파린(1000 IU/mL) 처리된 주사기를 사용하여 채혈하였다. 혈액은 13,200 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리한 후 -80°C 급속냉동고에서 분석 전까지 보관하였다. 채혈 후 즉시 간과 내장지방을 적출하여 생리식염수에 헹군 후 표면의 수분을 제거하고 무게를 측정하였으며 액체질소로 급속 동결하여 -80°C 급속냉동고에서 시료 분석 전까지 보관하였다.

혈액분석

혈장 글루코오스 농도와 인슐린 농도는 각각 글루코오스 측정용 시액(Asan, Seoul, Korea)과 mouse insulin ELISA kit(U-type, Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan)을 사용하여 측정하였다. 혈장 triglyceride(TG), total cholesterol(T-C) 및 high density lipoprotein cholesterol(HDL-C) 농도 측정은 각각 TG, T-C 및 HDL-C 측정용 시액(Asan)을 사용하였다.

간 조직 지질분석

간 조직의 TG 및 T-C 농도 측정을 위한 전처리는 Folch 등(14)의 방법에 따라 다음과 같이 처리하였다. 간 조직 0.5 g에 20배의 CHCl₃:CH₃OH(2:1, v/v) 용액을 가한 후 균질화하여 여과한 다음 질소가스로 건조시켰다. 다시 1 mL의 동일 추출 용매에 녹인 후 100 µL를 취하여 질소가스로 건조한 다음 Omodeo Salé 등(15)에 의해 수정·보완된 방법에 따라 1 mL의 에탄올에 녹여 그중 0.2 mL를 시료로 사용하였다. 0.2 mL의 시료에 0.5% Triton X-100과 3 mM sodium cholate가 포함된 TG 및 T-C 측정용 시액(Asan) 0.5 mL를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 지질을 정량하였다.

Western blot analysis

분석에 사용한 내장지방 조직은 RIPA buffer(0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 50 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5 M EDTA, 0.1 M EGTA)를 사용하여 총단백질을 용리시켜 균질화하였으며, BCA protein assay kit(Thermo, Rockford, IL,

USA)을 이용하여 단백질 정량을 하였다. 정량한 단백질은 10% SDS-PAGE에서 단백질을 분리한 후 gel을 poly-vinylidene difluoride membrane(PVDF, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 전이시켰다. 5% nonfat dried milk로 1시간 blocking을 한 다음, 1:1,000 비율로 희석한 1차 항체 P-AKT(Ser473), AKT, P-S6K(Thr389), S6K, P-AMP-activated protein kinase(AMPK, Thr172), AMPK(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)로 4°C에서 O/N 반응시켰다. 0.1% Tris-buffered saline tween-20(TBST)로 3번 세척한 후 1:1,000 비율로 희석한 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후 enhanced luminol-based chemiluminescent kit(Bio Science Technology, Pohang, Korea)을 사용하여 암실에서 medical X-ray film(CP-BU new; AGFA)에 노출해 현상하였다. Launch Vision Works LS 프로그램(Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Italy)을 이용하여 band를 정량하였다.

통계처리

실험의 모든 결과는 SPSS(ver. 19, IBM, Armonk, NY, USA) 통계처리 프로그램을 사용하였고, 각 항목에 따라 평균값±표준오차(standard error, SE)를 구하였다. 군별 유의성 검증을 위하여 analysis of variance(ANOVA) test를 하였고, 여러 군 간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 유의수준 P<0.05에서 사후검정을 하였다.

결과 및 고찰

체중 및 식이 섭취량에 미치는 영향

실험동물들의 체중증가량은 HFD군이 ND군보다 유의적으로 증가하였으며, HFD군보다 잠상산물을 급여한 군들의 체중증가량이 다소 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 식이 섭취량은 ND를 급여한 군들보다 고지방식을 급여한 군들이 유의적으로 낮은 것에 반해 식이 효율은 ND군보다 고지방식을 급여한 군들이 높은 경향을 보였다. 이러한 결과는 Lee 등(16)이 정상식을 급여한 쥐보다 총열량의 50%를 지방으로 급여한 쥐의 식이 섭취량이 유의적으로 감소하였으나 에너지 섭취량, 체중증가량, 식이 효율은 현저히 증가하였다는 보고와 일치한다.

본 실험에서 잠상산물을 급여한 군들의 체중감소 효과는 잠상산물 속에 에너지원으로 이용되지 못하는 섬유소가 포함되어 있어 장 내용물의 부피를 증가시키고 지방 흡수를 초기 단계부터 억제함으로써 체중 증가가 억제된 것이라고 생각된다(17). 잠상산물의 체중감소 효과와 관련하여 Kim 등(18)의 연구에서 1% 콜레스테롤을 급여한 흰쥐에 비해 같은 식이에 10% ML 추출물을 첨가한 군의 체중증가량이

Table 2. Effect of experimental diet on body weight gain and daily food intake

	Groups ¹⁾					
	ND	HFD	ML	SK	MF	CT
BWG (g) ²⁾	1.20±0.17 ^b	2.01±0.20 ^a	1.49±0.16 ^{ab}	1.61±0.27 ^{ab}	1.86±0.28 ^{ab}	1.87±0.23 ^{ab}
DFI (g/d) ³⁾	3.88±0.20 ^a	3.30±0.20 ^b	2.97±0.15 ^b	3.25±0.25 ^b	2.92±0.12 ^b	2.97±0.11 ^b
FER ⁴⁾	0.050±0.01 ^b	0.079±0.01 ^{ab}	0.091±0.02 ^a	0.070±0.01 ^{ab}	0.092±0.01 ^a	0.086±0.01 ^{ab}

¹⁾Groups are the same as Table 1.

²⁾BWG: body weight gain per week.

³⁾DFI (g/d): daily food intake.

⁴⁾FER (food efficiency ratio)=body weight gain/ food intake per day.

유의적으로 감소한 것이 보고되었다. 또한, Kim 등(13)은 당뇨 모델의 쥐에게 8주 동안 꾸지뽕 열수추출물(300 mg/kg)을 급여한 결과 대조군보다 체중증가량이 크게 감소한 것을 보고하였으며, Do 등(19)의 연구에서 2형 당뇨 모델의 쥐에게 누에고치로부터 추출한 실크 피브로인 가수분해물을 급여한 결과 대조군보다 체중이 감소하는 경향을 보였다. 반면 Park 등(17)의 연구 결과에서는 고콜레스테롤을 급여한 흰쥐에게 ML 추출물을 0.8%, 0.16%, 0.32%로 농도별로 첨가하여 급여하였을 때 각 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였고, Cho 등(20)의 보고에서도 고지방식에 ML 분말 및 추출물을 각각 1%, 0.22%를 첨가한 식이를 6주간 쥐에게 급여한 실험에서 고지방식이급여군과 실험군 간의 체중이 유의적인 차이를 보이지 않았다. Wu 등(10)은 고지방식을 먹인 쥐에서 MF 주스를 자유롭게 섭취시킨 결과 고지방식을 먹인 대조군보다 체중이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다고 보고하였다. Park 등(12)은 고지방식을 5주 동안 급여한 후 5주 동안 CT 분말을 급여한 쥐의 체중증가량이 대조군보다 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 잠상산물을 급여한 군 중 ML군에서 가장 큰 체중감소(26%) 효과가 나타났다.

혈장 포도당 및 인슐린 농도에 미치는 영향

고지방식을 급여하였을 때 혈장 포도당 농도는 ND군(75±8 mg/dL)보다 HFD군(149±8 mg/dL)이 유의적으로

증가하였다(Fig. 1A). HFD군보다 ML군의 혈당이 101±7 mg/dL로 유의적으로 감소하였으며, MF군은 108±18 mg/dL로 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. SK군, CT군의 혈당은 각각 150±20 mg/dL, 170±21 mg/dL로 HFD군과 유의적인 차이는 보이지 않았다. 혈장 인슐린 농도는 ND군(0.52±0.04 µg/mL)보다 HFD군이 1.40±0.21 µg/mL로 유의적으로 증가하였으며, HFD군보다 ML군(0.73±0.12 µg/mL)이 유의적으로 감소하였다(Fig. 1B). SK, MF, CT군의 혈장 인슐린 농도는 각각 1.45±0.23 µg/mL, 1.31±0.19 µg/mL, 1.38±0.20 µg/mL로 HFD군과 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않았다.

고지방식을 급여한 실험동물에서 비만으로 인한 인슐린 저항성은 고혈당과 고인슐린혈증을 초래하며(3), 고혈당 현상의 지속은 여러 당뇨 합병증의 원인이 되기 때문에 당뇨의 합병증을 줄이기 위해 혈당의 조절은 필수적이라고 할 수 있다. Król 등(8)의 연구 결과에 따르면 고지방식을 4주 동안 급여한 후 STZ를 투여하여 당뇨 모델을 만든 쥐에게 ML이 함유된 고지방식을 4주 동안 급여한 결과, 혈장 글루코오스 농도가 대조군보다 유의적으로 감소하였다. 또한, Tanabe 등(6)은 고당질식과 함께 ML분말을 60일 동안 급여한 군에서 대조군보다 공복 인슐린 농도가 감소한 것을 보고하였다. Lim 등(21)은 고지방식과 함께 ML과 MF의 혼합물을 12주 동안 급여했을 때 대조군보다 혼합물을 투여한 군의 공복혈당이 감소한 것을 보고하였다. 그러나 Wu 등(10)의 연구에서는 고지방식을 급여한 대조군과 고지

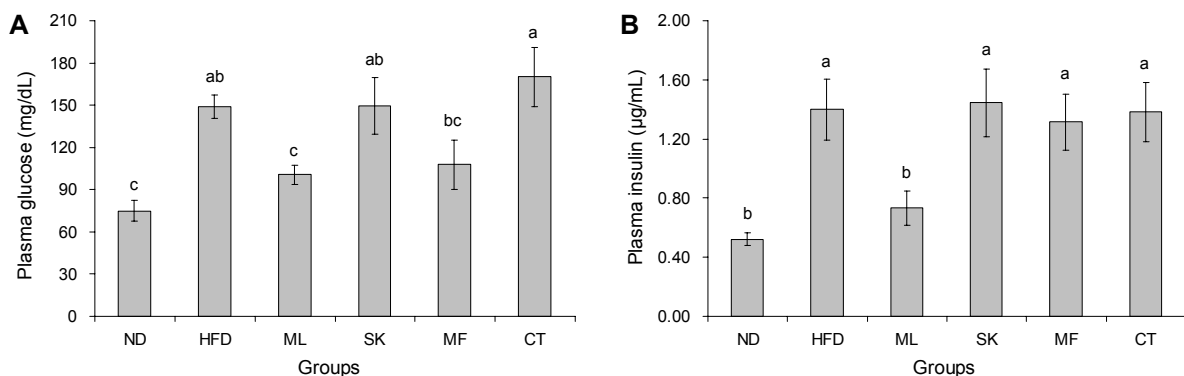


Fig. 1. Effect of sericultural products on plasma glucose (A) and plasma insulin (B) levels. All data are presented as mean±SE. Values with different letters above the bars are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $P < 0.05$. Groups are the same as Table 1.

방식이와 함께 MF주스를 12주 동안 자유롭게 섭취시킨 군 사이에 혈청 인슐린 농도의 차이는 없었다. Do 등(19)의 연구에 따르면 2형 당뇨 모델의 쥐에게 실크 피브로인 단백질을 급여한 결과 혈당이 정상군과 비슷한 수준으로 감소하였으며, 혈중 인슐린 농도 또한 감소하는 경향을 보였다. Park 등(12)의 보고에서는 고지방식이에 10% CT 잎 분말을 첨가한 식이를 5주간 흰쥐에 급여한 결과, 고지방식을 준 대조군에 비하여 혈당이 유의적으로 감소하였으며, Cha 등(22)의 연구에서는 인슐린 비의존적 당뇨쥐 모델에서 8주 동안 CT 뿌리껍질(50 g/kg)을 급여한 쥐의 혈청 인슐린 농도가 유의적으로 증가하였다. 본 연구에서는 SK, MF, CT의 경우 앞선 연구 결과와는 달리 혈중 글루코오스 및 인슐린 농도의 뚜렷한 변화가 나타나지 않았으나, ML 섭취 시 혈당 및 혈중 인슐린 농도의 감소로 고혈당 증상이 개선되는 것이 확인되었다.

혈장 지질 농도에 미치는 영향

혈장 T-C 농도는 ND군(135±8 mg/dL)보다 HFD군(239±25 mg/dL)에서 유의적으로 증가하였고, HFD군보다 ML군(167±10 mg/dL)과 SK군(171±19 mg/dL)이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2A). MF, CT군은 각각 211±16 mg/dL, 200±8 mg/dL로 다소 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. 말초조직으로부터 간으로 콜레스테롤을 운반하는 HDL-C 농도는 ML군, SK군, MF군, CT군이 각각 186±28

mg/dL, 209±28 mg/dL, 185±10 mg/dL, 196±6 mg/dL로 네 군 모두 HFD군(94±7 mg/dL)보다 유의적으로 높았다(Fig. 2B). HDL-C과 T-C 비율인 HTR은 HFD군보다 ML군과 SK군이 각각 3.2배, 3.3배로 현저히 증가하였고 MF군, CT군은 2.0배, 2.4배로 다소 증가하였다(Fig. 2C). 혈장 TG 농도는 ND군(85±7 mg/dL)보다 HFD군이 73±3 mg/dL로 다소 감소하였고, HFD군보다 ML군, SK군이 각각 58±2 mg/dL, 56±9 mg/dL로 감소하는 경향을 보였으나 각 군 간의 유의적인 차이는 없었다(Fig. 2D).

정상상태에서 식이로 섭취한 TG와 콜레스테롤은 조직세포에서 합성된 지질과 균형을 이루며 혈관 내에서 순환하는 지단백질의 농도와 함께 항상성에 의해 적절하게 조절되고 있다. 그러나 유전적 요인과 환경적 요인에 의해서 체내 지질의 균형이 깨어질 수 있는데 당뇨병은 인슐린의 상대적인 결핍으로 인해 탄수화물이 에너지원으로 이용되지 못하고 free fatty acid(FFA)가 에너지원으로 이용되면서 acetyl-CoA를 이용한 콜레스테롤 합성증가로 혈중 T-C 농도가 증가하게 된다(23). O'Meara 등(24)은 조절되지 않은 당뇨 상태에서 간의 hydroxymethylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase 활성이 증가하여 순환하는 혈액을 따라 콜레스테롤의 이동이 증가하게 되고 결과적으로 혈중 T-C 농도가 증가한다고 보고하였다. 또한, 당뇨 상태에서는 인슐린의 부족으로 인해 very low density lipoprotein(VLDL) 생성이 증가하는 반면 말초 조직에서의 LDL-C 활성 저하로 VLDL

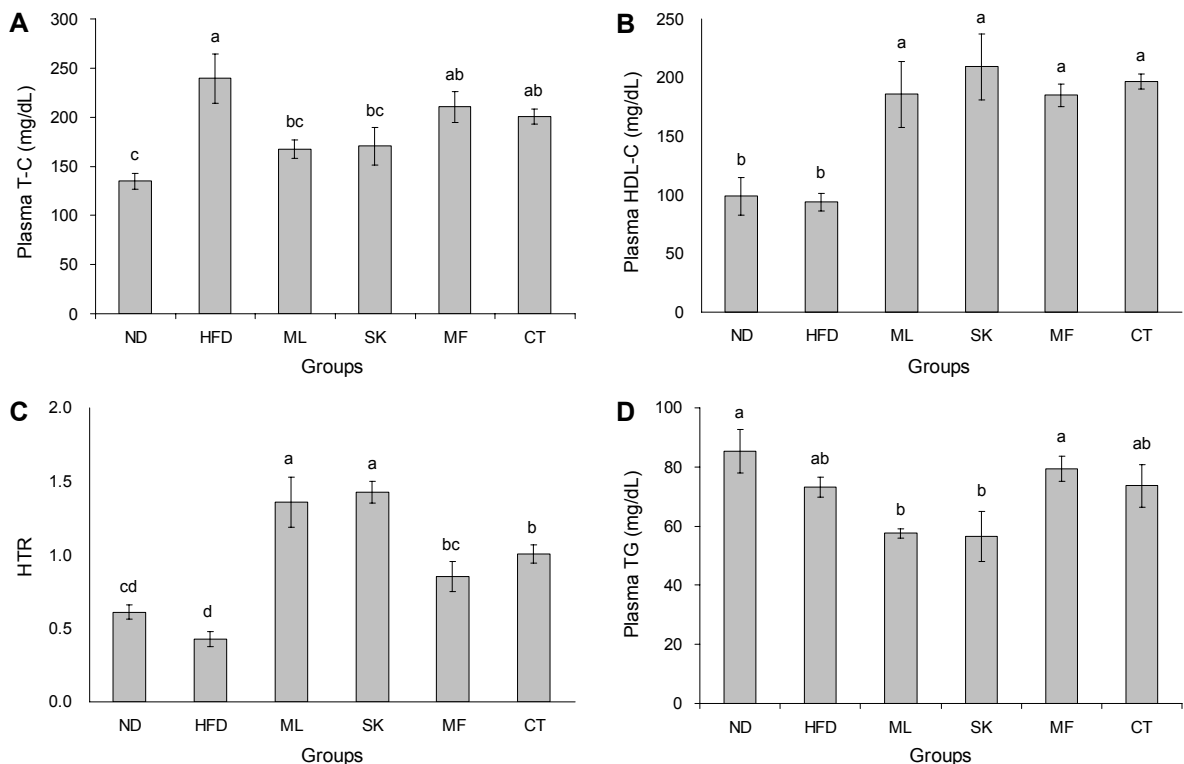


Fig. 2. Plasma lipid profiles in male C57BL/6N mice treated sericultural products for 14 weeks. Values are mean±SE. Values with different letters above the bars are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $P < 0.05$. T-C, total-cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; HTR, HDL-C/T-C. Groups are the same as Table 1.

과 chylomicron의 대사가 저하되는 결과가 초래되어 결국 혈중 TG의 농도가 증가하게 된다(25). 그러나 일반적인 사실과 다르게 본 연구에서는 ND군보다 HFD군의 혈장 TG 농도가 감소하였는데, 이는 HFD의 식이 구성 중 탄수화물의 비율이 ND의 탄수화물 비율보다 적기 때문으로 보이며, 고지방식을 급여한 마우스에서 혈중 TG가 감소하는 이러한 현상이 여러 번 보고된 바 있다(26-28). Guo 등(27)은 고지방 섭취로 인해 몸에서 TG의 합성을 감소시키거나 증가한 TG를 없애으로써 혈중 중성지질이 감소한다고 보고하였다.

잠상산물의 지질개선 효과에 대해서는 다수 보고된 바가 있는데, Cho 등(20)에 따르면 고지방식이에 ML분말을 1% 첨가하여 급여한 군에서 고지방식을 급여한 대조군보다 혈장 T-C 농도 및 TG 농도가 감소하였으며, HDL-C 농도 및 HTR이 증가하였다. Wu 등(10)은 고지방 식이와 MF주스를 12주 동안 제한 없이 공급한 실험에서 MF를 급여한 군의 혈청 T-C, TG 및 HDL-C 농도의 감소를 보고하였으며, Yang 등(29)은 5% 및 10% MF가루를 포함한 고지방식을 4주 동안 급여한 결과 고지방식이 대조군보다 MF군의 혈청 T-C, TG, LDL-C 농도가 감소했지만 HDL-C 농도는 증가하였다고 보고하였다. Kim 등(13)의 연구에서는 CT 잎물 추출물을 C57BL/6J-db/db 마우스에 8주 동안 급여한 결과, 아무것도 급여하지 않은 당뇨 대조군보다 혈중 TG, T-C가 유의적으로 낮아졌으나 HDL-C는 유의적인 차이가 없었다. 또한, 고지방식과 함께 10% CT 잎 분말을 섭취한 흰쥐의 T-C 농도가 대조군보다 감소하였으나, HDL-C 및 TG 농도는 유의적인 차이가 나지 않았다(12).

본 연구에서 MF와 CT 분말은 HDL-C 농도가 다소 증가한 것 외에 지질개선 효과가 명확하게 나타나지 않았으나 ML과 SK 분말의 지질개선 효과는 뚜렷하게 확인할 수 있었다.

간 조직 지질 농도에 미치는 영향

간 조직 지질 농도는 Fig. 3에 보이는 바와 같이 TG 농도는 HFD군(1.08 ± 0.062 mg/g liver)이 ND군(0.73 ± 0.061

mg/g liver)보다 유의적으로 증가하였으며, HFD군보다 SK군이 0.40 ± 0.048 mg/g liver로 가장 크게 감소하였다. ML군, MF군, CT군은 각각 0.58 ± 0.007 mg/g liver, 0.62 ± 0.019 mg/g liver, 0.57 ± 0.055 mg/g liver로 HFD군보다 유의적으로 감소하였다(Fig. 3A). 간 조직 T-C 농도 역시 ND군(0.33 ± 0.007 mg/g liver)보다 HFD군(0.41 ± 0.015 mg/g liver)에서 유의적으로 증가하였으며, HFD군에 비해 ML군(0.37 ± 0.013 mg/g liver), SK군(0.35 ± 0.013 mg/g liver), MF군(0.34 ± 0.009 mg/g liver), CT군(0.35 ± 0.005 mg/g liver)이 유의적으로 감소하였다.

비만은 산화적 스트레스를 비롯하여 간 조직에서 TG의 과도한 축적을 이끄는 지방대사 조절의 장애를 일으킨다. Holt 등(30)의 연구에 의하면 제1형 당뇨병보다 제2형 당뇨병에서 지방간의 빈도가 21~78%로 더 높으며, 혈액 및 간 조직에서 FFA의 증가로 간 조직에서의 TG 합성이 촉진되는 것으로 알려져 있다. TG 합성률이 VLDL로 분비시킬 수 있는 간의 능력을 초과하게 되면 지방간이 유발된다. 잠상산물의 간 조직 지질개선 효과와 관련하여 Cho 등(20)의 연구에서 고지방식을 급여한 군보다 ML분말(1%) 및 열수추출물(0.22%)을 급여한 군에서 간 조직 TG 농도 및 T-C 농도의 유의적 감소 결과가 보고된 바 있다. Wu 등(10)의 연구에서는 고지방식을 12주 동안 급여한 대조군보다 고지방식과 함께 MF주스를 자유롭게 섭취한 쥐의 간 조직 총 지질 농도와 TG 농도가 유의적으로 감소하였으나, T-C 농도는 크게 감소하지 않았으며 군 간의 유의적인 차이는 없었다. Yang 등(29)의 연구에서도 4주 동안 고지방식을 급여한 군보다 고지방식에 10% MF분말을 첨가한 군에서 간 조직 TG 농도 및 T-C 농도가 감소하였다고 보고한 바 있다. 그러나 앞서 보고된 연구 결과들에서 고지방식을 급여한 군보다 고지방식과 함께 잠상산물을 급여한 군에서 간 조직 T-C 농도의 유의적인 감소가 보이긴 하였으나 그 차이가 미미하였으며, 본 연구에서도 대조군보다 잠상산물을 급여한 군에서 간 조직 T-C 농도가 유의적으로 감소하였으나 그 차이가 크지 않았다.

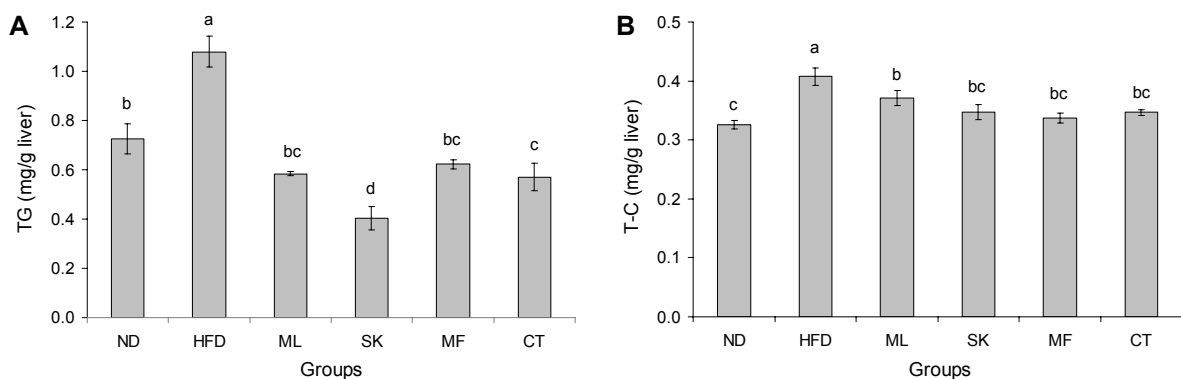


Fig. 3. Effects of experimental diets on lipid profiles in liver. C57BL/6N mice fed for 14 weeks of experimental diet. Values are mean±SE. Values with different letters above the bars are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $P < 0.05$. T-C, total-cholesterol; TG, triglyceride. Groups are the same as Table 1.

내장지방 내 insulin signaling 관련 단백질의 발현에 대한 잠상산물의 효과

당뇨병을 비롯한 대사성 질환의 공통적인 기전은 insulin/insulin like growth factor(IGF-1) 신호전달의 장애이다. 이 신호전달의 장애가 hypothalamus에서 일어나면 비만과 당뇨병을 유발할 수 있다고 알려져 있다. 인슐린이나 IGF-1이 insulin receptor(IR) 또는 IGF-1R과 결합하면 receptor에 autophosphorylation이 일어나고 insulin receptor substrate(IRS)가 결합하면 IRS 단백질에 tyrosine phosphorylation이 일어난다(31). 이는 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate(PI3Kinase)를 활성화하여 AKT를 인산화시킨다(32). AKT는 mammalian target of rapamycin(mTOR)을 인산화시킴으로써 단백질의 합성에 관여하는 S6K의 활성을 증가시킨다(33). 또한, AKT는 세포 내 포도당 조절에 관여하는 인자로서 glucose transporter-4 (GLUT4)가 세포막으로 translocation 되는 것을 증가시켜 포도당의 흡수를 증가시키고(34), glycogen synthase kinase (GSK)-3beta를 인산화시킴으로써 GSK-3beta 활성을 억제해 glycogen의 축적을 증가시킨다(35).

잠상산물을 급여하였을 때 insulin signaling 관련 단백질

들에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. 내장지방에서 AKT, S6K, AMPK의 단백질 발현 수준을 조사한 결과, pAKT(Ser473)의 발현량은 ND군보다 HFD군이 유의적으로 감소하였다(73%, Fig. 4). ML군과 MF군은 pAKT 단백질 발현이 HFD군보다 각각 312%, 211% 증가하였다. pS6K(Thr389)의 발현량은 ND군보다 HFD군이 유의적으로 감소하였으며(66%), HFD군보다 ML, MF군은 각각 165%, 212% 유의적으로 증가하였다. AMPK는 세포 내에서 에너지 항상성 유지의 센서 역할을 하는 효소로 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우 활성화된다(36). AMPK는 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고, 지방산 산화와 해당 과정을 촉진한다(37). pAMPK(Thr172)의 발현량은 ND군에 비하여 HFD군에서 감소하였으며, HFD군에 비하여 ML군, SK군, 그리고 CT군이 각각 144%, 126%, 179% 증가하였다.

Kuo 등(38)은 고지방식을 12주 동안 급여한 쥐의 골격근 조직에서 정상식을 급여한 쥐보다 p-AKT 및 p-AMPK 단백질 발현량이 감소하였으며, 간 조직에서 p-AMPK 단백질 발현량이 감소한 것을 보고하였다. 또한, Chiu 등(28)의 보고에 따르면 7주 동안 고지방식을 급여한 쥐의

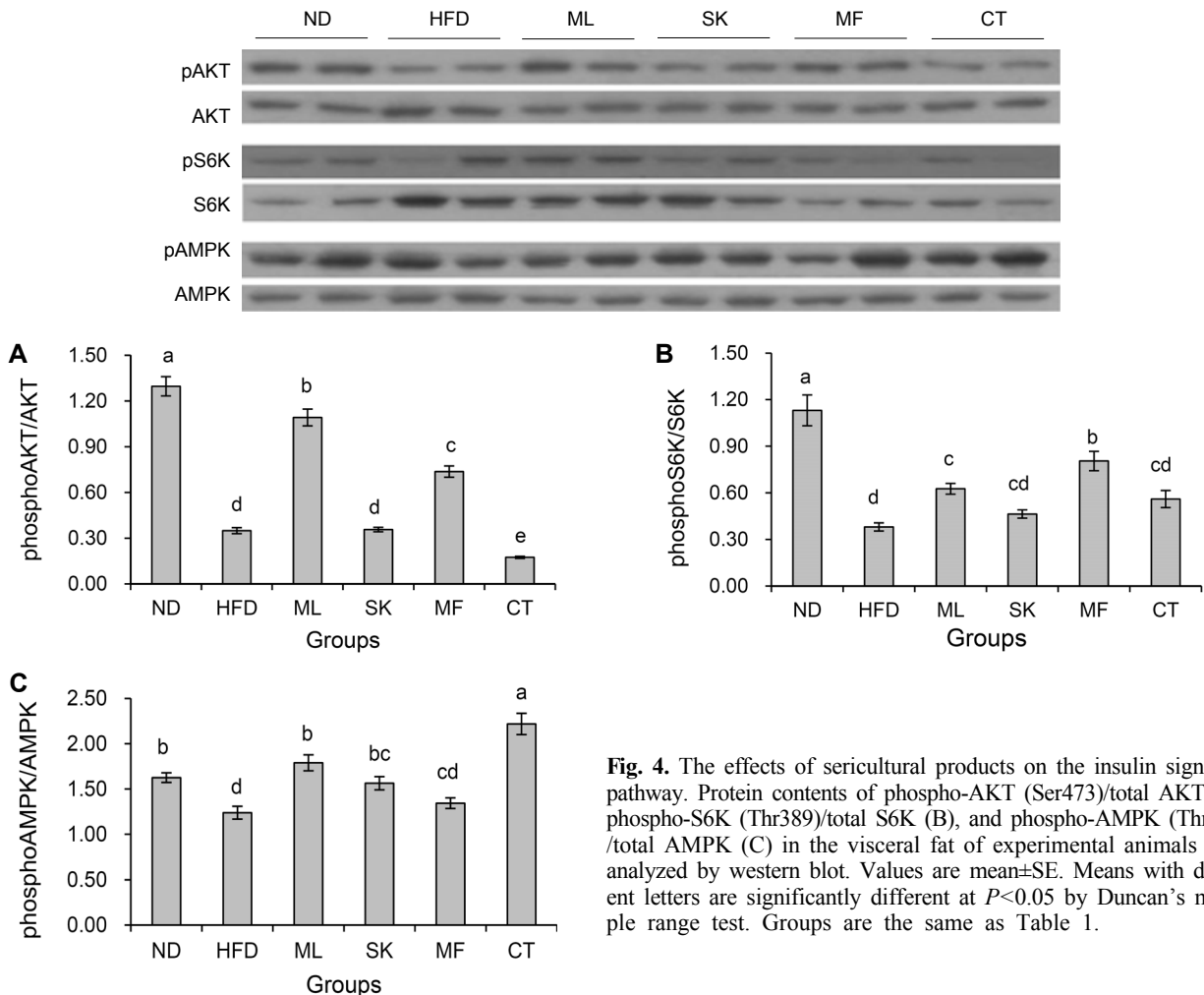


Fig. 4. The effects of sericultural products on the insulin signaling pathway. Protein contents of phospho-AKT (Ser473)/total AKT (A), phospho-S6K (Thr389)/total S6K (B), and phospho-AMPK (Thr172)/total AMPK (C) in the visceral fat of experimental animals were analyzed by western blot. Values are mean±SE. Means with different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Groups are the same as Table 1.

지방조직에서 p-AMPK α 의 발현량이 정상대조군보다 감소하였다. 고지방식이를 급여한 쥐에서 p-S6K 단백질 발현량의 변화와 관련하여 Lu 등(39)의 연구에서 정상식이를 급여한 쥐에 비해 p-S6K 단백질 발현량의 감소가 보고되었으나, Reynolds 등(40) 및 Dasuri 등(41)의 연구에서는 정상식이를 급여한 쥐보다 각각 변화가 없거나 증가함을 보고한 바 있다. 본 연구의 결과에서는 정상식이를 급여한 쥐보다 고지방식이를 급여한 쥐의 p-AKT, p-S6K 그리고 p-AMPK의 단백질 발현량이 감소하였다.

Gao 등(42)의 보고에 따르면 STZ 투여와 함께 고지방식이를 급여한 쥐에서 ML을 6주 동안 경구 투여하였을 때 간 조직의 PI3K p85 α 및 p-AKT2 단백질의 발현량이 유의적으로 증가하였다. 또한, CT 열매로부터 분리된 주요 이소플라보노이드인 6,8-diprenylgenistein을 고지방식이와 함께 6주 동안 급여한 결과, p-AMPK α 와 p-AMPK β 의 단백질 및 mRNA 발현량이 대조군보다 증가한 것이 보고되었다(43). 이상의 결과를 종합하여 볼 때, ML 및 MF 분말은 insulin signaling 관련 단백질인 AKT 및 S6K의 활성을 증가시켜 인슐린 저항성을 개선하며, ML, SK, CT 분말은 AMPK 활성의 증가로 지질개선 효과를 나타내는 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 고지방식이로 유도된 제2형 당뇨병 동물모델에서 잠상산물의 항당뇨 및 지질개선 효과를 규명하기 위하여 C57BL/6N 마우스에 14주간 잠상산물 분말(ML, SK, MF, CT)을 급여한 후 제2형 당뇨병의 임상적 지표 및 인슐린 신호 전달체계에 미치는 영향을 분석하였다. HFD군보다 잠상산물을 급여한 군들의 체중증가량이 감소하는 경향이었으며, 혈장 포도당 및 인슐린 농도는 HFD군보다 ML분말을 급여한 군에서 특히 감소하였다. 혈장 T-C 농도는 HFD군에 비하여 ML과 SK 분말 급여 군에서 유의적으로 감소하였으며, 혈장 HDL-C 농도 및 HTR은 HFD군보다 ML군과 SK군에서 현저히 증가하였다. 간 조직 지질 농도는 HFD군보다 잠상산물을 급여한 네 군 모두에서 TG와 T-C 농도의 유의적인 감소가 나타났다. 이상의 결과 잠상산물 중 ML분말이 혈장 포도당, 인슐린, T-C 및 TG 농도를 가장 효과적으로 감소시켰으며, 혈장 HDL-C 농도 및 HTR은 증가시켰다. 또한, 내장지방 조직의 AKT, S6K, 그리고 AMPK의 활성도 증가시킨 것으로 보아 고지방식이에 의한 인슐린 저항성 및 지질 대사를 개선한 것으로 생각된다. 향후 ML의 인슐린 저항성 개선 효과에 대해 더 깊이 있는 기전연구가 수행된다면 제2형 당뇨병환자를 위한 건강기능성 식품으로 개발될 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 Regional Innovation System

(RIS) program(R0002111)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Ministry for Health, Welfare and Family Affairs; Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2014. National Health Nutrition Examination Survey Report. Korea Centers for Disease Control and Prevention, Cheongju, Korea.
2. Choi CS, Park SW. 2002. The mechanism of development of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Korean J Med* 63: 613-625.
3. Kaushik G, Satya S, Khandelwal RK, Naik SN. 2010. Commonly consumed Indian plant food materials in the management of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 4: 21-40.
4. Van Gaal L, Scheen A. 2015. Weight management in type 2 diabetes: current and emerging approaches to treatment. *Diabetes Care* 38: 1161-1172.
5. Publishing Committee of Pharmacognosy. 2000. *Pharmacognosy*. Dongmyongsa, Seoul, Korea. p 257.
6. Tanabe K, Nakamura S, Omagari K, Oku T. 2011. Repeated ingestion of the leaf extract from *Morus alba* reduces insulin resistance in KK-Ay mice. *Nutr Res* 31: 848-854.
7. Jang MJ, Rhee SJ. 2004. Hypoglycemic effects of pills made of mulberry leaves and silkworm powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1611-1617.
8. Król E, Jeszka-Skowron M, Krejpcio Z, Flaczyk E, Wójciak RW. 2016. The effects of supplementary mulberry leaf (*Morus alba*) extracts on the trace element status (Fe, Zn and Cu) in relation to diabetes management and antioxidant indices in diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 174: 158-165.
9. Ann JY, Eo H, Lim Y. 2015. Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice. *Genes Nutr* 10: 46.
10. Wu T, Tang Q, Gao Z, Yu Z, Song H, Zheng X, Chen W. 2013. Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. *PLoS One* 8: e77585.
11. Andallu B, Suryakantham V, Lakshmi Srikanthi B, Reddy GK. 2001. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 314: 47-53.
12. Park JH, Lee KW, Sung KS, Kim SS, Cho KD, Lee BH, Han CK. 2012. Effect of diets with Job's tears and *Cudrania tricuspidata* leaf mixed-powder supplements on body fat and serum lipid levels in rats fed a high-fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47: 943-949.
13. Kim OK, Nam DE, Jun W, Lee J. 2015. *Cudrania tricuspidata* water extract improved obesity-induced hepatic insulin resistance in *db/db* mice by suppressing ER stress and inflammation. *Food Nutr Res* 59: 29165.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
15. Omodeo Salè F, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. 1984. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* 142: 347-350.
16. Lee JS, Lee MK, Ha TY, Bok SH, Park HM, Jeong KS, Woo MN, Do GM, Yeo JY, Choi MS. 2006. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet. *Food Chem Toxicol* 44: 1875-1883.
17. Park SH, Jang MJ, Hong JH, Rhee SJ, Choi KH, Park MR.

2007. Effects of mulberry leaf extract feeding on lipid status of rats fed high cholesterol diets. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 43-50.
18. Kim AJ, Kim SY, Choi MK, Kim MH, Han MR, Chung KS. 2005. Effects of mulberry leaves powder on lipid metabolism in high cholesterol-fed rats. *Korean J Food Sci Technol* 37: 636-641.
 19. Do SG, Park JH, Nam H, Kim JB, Lee JY, Oh YS, Suh JG. 2012. Silk fibroin hydrolysate exerts an anti-diabetic effect by increasing pancreatic β cell mass in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Vet Sci* 13: 339-344.
 20. Cho YS, Shon MY, Lee MK. 2007. Lipid-lowering action of powder and water extract of mulberry leaves in C57BL/6 mice fed high-fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 405-410.
 21. Lim HH, Yang SJ, Kim Y, Lee M, Lim Y. 2013. Combined treatment of mulberry leaf and fruit extract ameliorates obesity-related inflammation and oxidative stress in high fat diet-induced obese mice. *J Med Food* 16: 673-680.
 22. Cha JY, Kim HJ, Cho YS. 2000. Effects of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 531-536.
 23. Kim SH, Kang JS, Lee SJ, Chung YJ. 2008. Antidiabetic effect of Korean red ginseng by puffing process in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 701-707.
 24. O'Meara NMG, Devery RAM, Owens D, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. 1990. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* 39: 626-633.
 25. Nikkilä EA, Kekki M. 1973. Plasma triglyceride transport kinetics in diabetes mellitus. *Metabolism* 22: 1-22.
 26. Biddinger SB, Almind K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi JM, Kahn CR. 2005. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* 54: 1314-1323.
 27. Guo J, Jou W, Gavrilova O, Hall KD. 2009. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS One* 4: e5370.
 28. Chiu CY, Chan IL, Yang TH, Liu SH, Chiang MT. 2015. Supplementation of chitosan alleviates high-fat diet-enhanced lipogenesis in rats via adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase activation and inhibition of lipogenesis-associated genes. *J Agric Food Chem* 63: 2979-2988.
 29. Yang X, Yang L, Zheng H. 2010. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem Toxicol* 48: 2374-2379.
 30. Holt RIG, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. 2010. *Textbook of diabetes*. 4th ed. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK. p 56-60.
 31. Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. 1999. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96: 329-339.
 32. Köner AC, Brüning JC. 2012. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* 16: 144-152.
 33. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. 2005. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* 30: 35-42.
 34. Lee YS, Cha BY, Saito K, Yamakawa H, Choi SS, Yamaguchi K, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. 2010. Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic *ob/ob* mice. *Biochem Pharmacol* 79: 1674-1683.
 35. Chakraborty A, Koldobskiy MA, Bello NT, Maxwell M, Potter JJ, Juluri KR, Maag D, Kim S, Huang AS, Dailey MJ, Saleh M, Snowman AM, Moran TH, Mezey E, Snyder SH. 2010. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, regulate insulin sensitivity and weight gain. *Cell* 143: 897-910.
 36. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. 2002. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2074-2081.
 37. Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29: 18-24.
 38. Kuo YH, Lin CH, Shih CC. 2015. Ergostatrien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* inhibits diabetes and hyperlipidemia in high-fat-diet treated mice via regulation of hepatic related genes, glucose transporter 4, and AMP-activated protein kinase phosphorylation. *J Agric Food Chem* 63: 2479-2489.
 39. Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, Shan Q. 2011. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav Immun* 25: 1658-1667.
 40. Reynolds TH IV, Cinquino N, Anthony M, Phelps CB, Zachary Berk E. 2009. Insulin resistance without elevated mammalian target of rapamycin complex 1 activity in muscles of mice fed a high-fat diet. *J Appl Physiol* 107: 1479-1485.
 41. Dasuri K, Zhang L, Kim SOKF, Bruce-Keller AJ, Keller JN. 2016. Dietary and donepezil modulation of mTOR signaling and neuroinflammation in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1862: 274-283.
 42. Gao Y, Zhang M, Wu T, Xu M, Cai H, Zhang Z. 2015. Effects of D-pinitol on insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *J Agric Food Chem* 63: 6019-6026.
 43. Jo YH, Choi KM, Liu Q, Kim SB, Ji HJ, Kim M, Shin SK, Do SG, Shin E, Jung G, Yoo HS, Hwang BY, Lee MK. 2015. Anti-obesity effect of 6,8-diprenylgenistein, an isoflavonoid of *Cudrania tricuspidata* fruits in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients* 7: 10480-10490.