

ORIGINAL ARTICLE

고지방식이(HFD)/streptozotocin(STZ) 유도 당뇨모델에서 여주가 글루카곤 분비에 미치는 영향

김성은 · 김상백¹⁾ · 김슬기 · 김현규 · 박병준¹⁾ · 이학성*

콜마비엔에이치(주) 식품과학연구소, ¹⁾(주)한국콜마 피부천연물연구소

Effect of *Momordica charantia* on Glucagon Secretion in High-fat diet(HFD)/Streptozotocin(STZ)-induced Diabetic Rat

Seong-Eun Kim, Sang-Back Kim¹⁾, Seul Ki Kim, Hyun-Kyu Kim, Byoungjun Park¹⁾,
Hak Sung Lee*

Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co. Ltd., Seoul 06800, Korea

¹⁾Skin & Natural products Lab. Kolmar Korea Co. Ltd., Seoul 06800, Korea

Abstract

In present study, we investigated the antidiabetic effect of *Momordica charantia*(as well known “bitter melon”). This study was conducted to determine antidiabetic mechanism of Bitter Melon Extract (BME). We measured blood glucose, insulin, glucagon level in a Sprague-Dawley rat model of high-fat diet/streptozotocin(HFD/STZ)-induced diabetes. Five experimental groups were used: normal, HFD/STZ, BME 62.5 mg/kg HFD/STZ, BME 125 mg/kg HFD/STZ and BME 250 mg/kg HFD/STZ. BME was orally administered to the rats every other day for 9 weeks. Results showed that fasting blood glucose levels were significantly lower in the BME 125 mg/kg(150.17 ± 20.22 mg/dL) and 250 mg/kg(124.17 ± 22.17 mg/dL) groups than in the vehicle group(188.83 ± 26.63 mg/dL)($p < 0.05$). In addition, glucagon levels were lower in the three BME treatment groups than in the vehicle group($p < 0.05$). Oral glucose tolerance tests revealed that the BME 250 mg/kg group had significantly($p < 0.05$) reduced 120-minute blood glucose levels and areas under the curve. Our results suggest that BME induces antidiabetic effects via the reduction of glucagon and blood glucose levels.

Key words : *Momordica charantia*, Diabetes, Blood sugar, Glucagon, Health supplement

1. 서론

당뇨병(Diabetes)은 체내 대사 작용의 이상으로 정상적인 혈당조절이 이루어지지 않아 비정상적으로 혈당이 높아지는 만성 질환으로서 주로 대사증후군 이후 심화되

어 발생한다. 전세계적으로 당뇨인구는 증가하고 있으며 2025년까지 3억명 이상으로 증가할 것으로 예상된다(Adeghate et al., 2006). 이러한 환자들 중 90~95%는 제 2형 당뇨환자들이 대부분이며 주요 원인은 인슐린 저항성으로 알려져 있다(Shin et al., 2014). 국내에서도 30세

Received 8 July, 2020; Revised 30 July, 2020;

Accepted 14 August, 2020

*Corresponding author: Hak Sung Lee, Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co. Ltd., Seoul 06800, Korea
Phone: +82-2-3459-5821
E-mail: mildpeople@kolmarbnh.co.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이상 성인 7명중 한명이 당뇨병으로 진단되어 14.4%의 유병률을 보였으며 65세 이상에서는 10명중 3명으로 29.8%의 높은 유병률을 보였다. 또한 최근 6년간 당뇨병의 유병률은 11.4%에서 14.5%사이로 집계되었는데 인구증가를 고려하면 당뇨병 환자는 매년 증가한 셈이다 (Kyoung, 2018). 이러한 제2형 당뇨병에서 혈당 상승의 주요 원인으로 인슐린 저항성과 함께 글루카곤 분비의 증가가 동반될 경우 혈당이 더욱 큰 폭으로 상승하게 되며 당뇨 동물모델이나 환자에게서 글루카곤의 수치 혹은 인슐린/글루카곤 비율이 증가하는 것으로 보고되어있다 (Jiang and Zhang, 2003). 또한 당뇨병환자에게서 나타나는 만성적인 고글루카곤혈증(Hyperglucagonemia)은 간에서 glucose분비 증가와 당뇨의 증상인 고혈당증(Hyperglycemia)의 원인이 되는 것으로 알려져있다 (Consoli, 1992). 따라서 제2형 당뇨를 개선하는 것이 혈당 감소 및 개선을 위한 주요 관점이 되고 있다.

쓴오이라고도 불리는 여주(*Momordica charantia*)는 박과의 열대 및 아열대성 식물로 식용이 가능하며 아시아, 아프리카, 카리브해 연안에 넓게 분포해 있다. 특히 오래전부터 아시아와 아프리카 일대에서는 약용식물로 여주를 활용해 왔는데(Grover and Yadav, 2004; Beloin et al., 2005), 인도에서는 전통적으로 당뇨, 복통, 설사, 담즙병, 구토, 기생충에 사용해 왔다(Wang et al., 2014).

여주에는 glycoside, saponin, alkaloids, fixed oils, triterpene, steroid 등과 같은 활성물질이 다량 함유되어 있어 혈당상승 억제와 같은 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Raman and Lau, 1996). 또한 여주는 당뇨 동물모델에서 혈당의 감소외에 합병증(신장병, 신경병증, 위장병, 백내장등)도 개선하거나 예방하는 효과가 있는 것으로 보고되어있다(Grover et al., 2001, 2002; Vikrant et al., 2001; Rathi et al., 2002). 여주에 대한 이전의 연구는 대부분 혈당과 인슐린 저항성에 주로 초점이 맞추어져 있고 고혈당증에 작용하는 글루카곤에 관련된 효능에 대해서는 인슐린 대비 연구결과가 적다. 하지만 여주는 STZ로 손상된 췌장의 알파세포의 회복을 촉진시키고(Ahmed et al., 1998), 정상 랫드 및 STZ유도 당뇨 랫드에 여주를 경구투여할 경우 글루카곤 분비량을 감소시키는 glucagon-like peptide-1(GLP-1)을 증가시키는 것으로 보고되어있다(Bhat et al., 2018;

Elekofehinti et al., 2018). 이렇듯 여주는 글루카곤의 분비에 영향을 주어 고혈당증을 개선시킬 수 있는 가능성이 있으며 이를 확인하기 위해 연구를 수행하였으며 평가를 위한 동물모델로 HFD/STZ유도 당뇨 랫드를 모델로 선정하였다. HFD/STZ모델은 HFD를 통해 제2형 당뇨를 유도하는 과정에서 STZ를 투여하여 당뇨 유도를 가속시키는 모델로서 이전의 연구에서 적합성을 확인한 바 있다(Kim et al., 2018). 본 연구에서는 HFD/STZ유도 당뇨 랫드에 9주간 추출물을 경구투여시켜 여주가 혈당 및 글루카곤에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 투여 시료의 제조

실험에 사용된 시료는 경상남도 함양에서 재배한 국내산 미숙여주를 구매하여 사용하였다. 미숙여주에 70% 주정알콜(ethanol)을 원재료대비 15배 투입하여 70°C에서 4시간 동안 1차 추출한 뒤 여과하고 남은 잔사에 다시 10배수의 용매를 투입한 뒤 2시간동안 2차 추출하였다. 추출물은 감압농축기를 사용하여 15~20 brix로 농축한 뒤 텍스트린(49%), 레시틴(1%)의 비율로 혼합하고 분무건조한 미숙여주주정추출분말(Sugar Katcher S52™)를 사용하였다.

2.2. 당뇨 유발

5주령된 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) rat를 Orient BIO(Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 7일간의 검역, 순화 기간을 거친 후, 모든 동물에 고지방식이(D12492, 60% kcal from fat, Research Diet Inc, USA)를 급이하고 고지방식이 1주일 후에 STZ(Sigma, USA, 30mg/kg in 0.1M citric acid buffer, pH 4.5)를 1ml/kg 용량으로 1주 간격으로 2회 복강 내 투여 하여 당뇨를 유발 시켰다. 동물실험은 (주)케이피씨(Gwangju, Korea) 동물실험윤리위원회의 승인(P202001) 후 진행되었다.

2.3. 군분리 및 일반 증상 관찰

검역 및 순화 기간 중 이상이 발견되지 않은 건강한 동물들은 군 분리 하루 전 동물의 경정맥을 통해 채혈한 혈액으로 혈중 Insulin 및 Glucagon level을 측정하였다. Insulin과 Glucagon의 level은 insulin ELISA kit

(Morinaga Ultrasensitive Rat Insulin Elisa kit, Morinaga Institute of Biological Science, Japan)와 Glucagon Elisa kit (Rat Glucagon ELISA Kit, R&D Systems, USA)로 측정되었으며 micro plate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA)를 이용하여 450/630 nm에서 흡광도를 확인하였다.

군분리 당일에 전 개체를 대상으로 비절식 혈당 및 당화혈색소를 측정하였다. 비절식 혈당과 당화혈색소 검사는 동물의 꼬리 미부 끝부분을 scissor로 미세하게 절개하여 자연스럽게 흘러나오는 전혈을 통해 검사하였고 혈당은 간이용 혈당 측정기인 Accu-CHEK® (Performa, Roche Diagnostics GmbH, Germany), 당화혈색소는 당화혈색소 키트 분석기 (DCA Vantage TM analyser, SIEMENS, UK)를 이용하여 측정하였다.

군분리는 측정한 비절식혈당, 당화혈색소, 혈중 Insulin 및 혈중 Glucagon 검사 값을 기준으로 측정값의 평균이 유사하도록 Normal, HFD/STZ 군, BME 62.5 투여 HFD/STZ군(62.5 mg/kg body weight/day), BME 125 투여 HFD/STZ군(125 mg/kg body weight/day), BME 투여 250 HFD/STZ군(250 mg/kg body weight/day) 총 5개의 군 (n = 6)으로 군분리를 실시하였다. 모든 동물의 체중과 사료 섭취량은 매주 1회 측정하였다.

2.4. 절식 혈당

절식 혈당은 미숙여주주정추출분말 투여 개시 후 9주차에 측정하였으며 측정 전 16시간 절식 후 혈당 측정기인 Accu-CHEK®(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 동물의 꼬리 미부 끝부분을 scissor로 미세하게 절개하여 자연스럽게 흘러나오는 전혈로 측정하였다.

2.5. 당화혈색소(HbA1c) 측정

당화 혈색소의 측정은 군 분리 당일과 미숙여주주정추출분말 투여 개시 후 9주차에 측정하였고, 당화혈색소 키트 분석기 (DCA Vantage TM analyser, SIEMENS, UK)를 이용하여 측정하였다.

2.6. 혈중 Insulin, Glucagon 측정

혈중 Insulin, Glucagon 분석은 미숙여주주정추출분말 투여 개시 후 9주차에 동물의 경정맥을 통해 채혈한

혈액이 완전히 굳힌 후에 6,000 rpm으로 10분간 원심분리(Supra 22K, Hanil, Incheon, Korea)하여 혈청을 취하고 -70°C의 deep freezer (Model 706, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)에 보관하였다. 혈중 인슐린 측정은 인슐린 ELISA kit (Morinaga UltraSensitive Mouse/Rat Insulin ELISA Kit, Morinaga Institute of Biological Science, Japan)을 이용하였고, 혈중 Glucagon 측정은 Rat Glucagon ELISA Kit (DGCG0, R&D Systems, USA)를 이용하였다. 흡광도는 450/630 nm에서 micro plate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.7. 경구 당부하 시험

경구 당부하 시험은 미숙여주주정추출분말 투여 개시 후 9주차에 진행하였다. 모든 동물을 경구 당부하 시험 전날부터 16시간 동안 절식시키고 혈당을 측정한 후 2 g/kg의 glucose (D-(+)-Glucose, Sigma, USA)를 경구 투여한 후 15분, 30분, 60분과 120분에 혈당을 측정하였다. 혈당의 측정은 혈당 측정기인 Accu-CHEK®을 이용하여 동물의 꼬리 미부 끝부분을 scissor로 미세하게 절개하여 자연스럽게 흘러나오는 whole blood로 측정하였다. 시간대 별 혈당 측정치를 이용하여 경시적 변화를 기록하고, 그래프의 밀면적 (Area Under the Curve, AUC)을 SigmaPlot (version 10.0 Systat Software Inc., USA)을 사용하여 산출하고 각 그룹 간 내당능을 비교하였다.

2.8. 조직학적 검경 분석

일정한 부위의 췌장-비장엽 부위를 각각 세로로 절단한 다음, 10% 중성포르말린에 재고정하고, 일반적인 방법으로 탈수 및 파라핀 포매를 실시하였으며, 전동 microtome(RM2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)를 이용하여 3-4 μm 두께로 3장의 연속 절편을 제작하였다. 일반 조직병리학적 변화를 관찰하기 위해 hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 실시하였으며, 췌장의 glucagon 분비세포(α 세포) 및 insulin 분비세포(β 세포)를 각각 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)기반 면역조직화학적으로 염색하였다. 조직 내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 methyl alcohol에 과산화수소수를 0.3% 농도로 첨가한 용액으로 30분간 반응시켰으며, 조직 내의 비특이적인 반응을

Table 1. Effect of bitter melon(*Momordica charantia*) extracts on blood glucose levels of HFD/STZ-induced diabetic rats

Group	Glucose level (mg/dL)
Normal	100.83±6.82
HFD/STZ	188.83±26.63
BME 62.5 HFD/STZ	161.00±20.94
BME 125 HFD/STZ	150.17±20.22*
BME 250 HFD/STZ	124.17±22.17***

The data are presented as means±SD of 6 independent rats. Statistical analyses were performed by Dunnett's test (control column=HFD/STZ) after one-way ANOVA and using SPSS software. *: $P<0.05$, ***: $P<0.001$.

방지하기 위해 말의 정상 혈청을 사용하였다. 면역혈청으로는 Anti-insulin antibody(Abcam, Cambridge, MA, USA), Anti-glucagon antibody(Abcam, Cambridge, MA, USA)을 각각 1:100, 1:1000으로 희석한 용액을 사용하여 4°C의 습윤 chamber에서 24시간 반응시켰고, 2차 항체로는 biotinylated universon antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였으며, ABC reagent(Vector Labs, Burlingame, CA, USA)에 1시간 반응시켰다. 마지막으로 peroxidase substrate kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)로 3분간 반응시켰다. 면역조직화학적 염색 후에는 Mayer's hematoxylin (MUTO, Japan)으로 감별 염색한 뒤 탈수과정을 거쳐 봉입하한 후 광학현미경(Model Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 보다 명확한 조직병리학적 관찰을 위해, 평균 췌장섬 수 (islets/cm² of pancreas) 및 직경(μ m)과 외분비 단위 면적당 효소원 (zymogen) 과립이 차지하는 비율 (%/mm² of exocrine pancreas), insulin과 glucagon 분비 면역반응세포의 수 (cells/mm² of pancreas) 및 이들의 비율(insulin/glucagon immunolabeled cells)을 컴퓨터 기반 자동영상분석장치 (iSolution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Bernaby, BC, Canada) 및 카메라 시스템(ProgRes™ C5, Jenoptik Optical Systems GmbH, Jena, Germany)을 이용하여 측정하였다.

2.9. 통계 처리

실험에서 얻어진 모든 실험 결과는 평균치±표준편차로 표시하고 SPSS (version 20, IBM SPSS Statistics, USA)를 사용하여 검증하였다. 모든 결과들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하였으

며, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's test를 실시하였다(유의수준: 양측 5% 및 1%).

3. 결과 및 고찰

3.1. 미숙여주정추출분말의 경구투여로 인한 혈당

조절 효과

HFD/STZ 로 유발된 당뇨 모델 rat의 절식 혈당의 농도는 Table 1과 같다. BME 125 투여 HFD/STZ군과 BME 250 투여 HFD/STZ군의 경우 각각 150.17±20.22 mg/dL($P<0.05$), 124.17±22.17 mg/dL($P<0.001$)로 측정되어 HFD/STZ 군의 188.83±26.63 mg/dL에 비해 유의적인 감소가 나타났다. 또한 BME 62.5 투여 HFD/STZ군의 경우 161.00±20.94 mg/dL로 유의적인 차이는 없었으나 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 미숙여주정추출분말의 투여가 글루카곤 및 인슐린 수치를 개선함으로써 절식 혈당을 감소시켜주는 것으로 생각된다.

3.2. 미숙여주정추출분말의 경구투여로 인한 혈중

glucagon 및 insulin 농도 변화

미숙여주정추출분말의 경구투여로 인한 HFD/STZ rat의 혈중 glucagon, insulin의 농도는 Table 2에 나타내었다. BME 62.5 투여 HFD/STZ군의 경우 69.11±6.29 pg/mL로 측정되어 HFD/STZ 군의 95.39±9.75 pg/mL에 비해 유의적인 감소가 나타났고 BME 125 투여 HFD/STZ군과 BME 250 투여 HFD/STZ군의 경우 각각 80.22±5.35 pg/mL, 79.89±3.25 pg/mL로 측정

Table 2. Effect of bitter melon(*Momordica charantia*) extracts on serum glucose levels of HFD/STZ-induced diabetic rats

Group	Glucagon(mg/dL)	Insulin(ng/mL)	Glucagon/Insulin(ratios)
Normal	103.50±11.64	2.29±1.2	53.29±20.14
HFD/STZ	95.39±9.75	0.49±0.05	193.91±18.96
BME 62.5 HFD/STZ	69.11±6.29**	1.12±1.33	123.09±75.83*
BME 125 HFD/STZ	80.22±5.35*	0.86±0.55	118.25±52.59*
BME 250 HFD/STZ	79.89±3.25*	1.01±0.64	96.96±37.56**

The data are presented as means±SD of 6 independent rats. Statistical analyses were performed by Dunnett's test (control column=HFD/STZ) after one-way ANOVA and using SPSS software. *: $P<0.05$, **: $P<0.005$.

되어 유의적인 감소가 나타났다. insulin 농도의 경우 BME 62.5 투여 HFD/STZ 군에서 1.12 ± 1.33 ng/mL, BME 125 투여 HFD/STZ 군에서 0.86 ± 0.55 ng/mL, BME 250 투여 HFD/STZ 군에서 1.01 ± 0.64 ng/mL로 나타나 HFD/STZ 군에 비해 증가 되는 경향을 확인하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. glucagon과 insulin의 비율은 HFD/STZ 군에서 193.91 ± 18.96 로 측정되어 Normal 군 대비 크게 증가하였으나 여주의 투여로 인해 비율의 수치가 유의적으로 감소되는 것을 확인 하였다. 이전 임상 연구(Lee et al., 2019)에 따르면 glucagon과 insulin의 비율이 높게 나타나는 2형 당뇨병 환자에게서 혈당 조절이 더욱 어려운 것으로 보고되었다. 따라서 미숙여주주정추출분말의 투여가 glucagon의 분비를 유의하게 억제하여 glucagon과 insulin의 비율을 낮추고 이를 통해 혈당 조절에 효과를 나타내는 것으로 확인 되었다. 미숙여주주정추출분말의 어떠한 성분이 이러한 효과를 나타내는지에 대하여 추후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

3.3. 미숙여주주정추출분말의 경구투여가 경구당부하 검사에 미치는 영향

미숙여주주정추출분말 경구투여가 HFD/STZ rat의 경구 당부하 시 미치는 영향을 알아보기 위하여 glucose를 경구 투여 후 일정 시간(0, 15, 30, 60, 120분)에 채혈하여 측정된 결과를 Fig. 1, Table 3에 나타내었다. Table 3의 결과에 따르면 glucose 투여 후 15분 후부터 혈당이 상승되기 시작하였다. BME 62.5 투여 HFD/STZ 군의 경우 glucose 투여 120분 경과 후 시점에 HFD/STZ 군 대비 유의한 감소가 확인되었으며 BME 125 투여 HFD/STZ 군 역시 투여 120분 경과 후에 유의한 감소가

관찰되었다. 특히 BME 250 투여 HFD/STZ 군은 glucose 투여 후 투여 후 15분 경과 시점을 제외한 전 구간에서 HFD/STZ 군 대비 유의적 감소를 확인하였다. Glucose 곡선 하 면적(area of under curve, AUC)은 Fig. 1에 나타내었다. 모든 여주 투여 군에서 HFD/STZ 군 대비 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며 62.5 투여군의 경우 약 10.10%, 125 투여군의 경우 6.10%, 250 투여군의 경우 17.04% 감소하였다. 경구당부하 검사의 경우 당뇨초기 가장 좋은 조기진단법으로서, 공복 혈당 측정시 보다 더 많은 내당능 이상을 진단할 수 있는 것으로 알려져 있다(Son, 2008). 이러한 결과는 미숙여주주정추출분말의 경구투여가 당뇨초기의 내당능 장애를 개선시켜 줄 수 있을 것으로 예상된다.

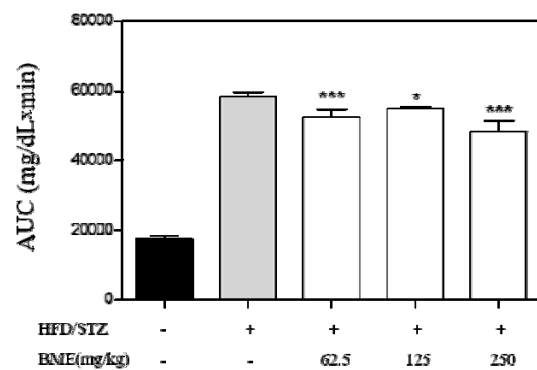


Fig. 1. Effect of bitter melon(*Momordica charantia*) extracts on area under the curve(AUC) by oral glucose tolerance test(OGTT).

The data are presented as means±SD of 6 independent rats. Statistical analyses were performed by Dunnett's test (control column=HFD/STZ) after one-way ANOVA and using SPSS software. *: $P<0.05$, **: $P<0.005$, ****: $P<0.001$.

Table 3. Effect of bitter melon(*Momordica charantia*) extracts on blood glucose levels and area of under curve (AUC) by oral glucose tolerance test (OGTT)

Group	Glucose levels(mg/dL)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Normal	106.00±12.85	176.00±15.70	158.33±18.90	148.00±11.88	121.50±11.41
HFD/STZ	233.17±37.17	399.33±42.02	550.00±45.59	541.83±18.08	458.50±30.89
BME 62.5 HFD/STZ	199.67±31.25	382.83±86.10	536.67±49.32	483.00±52.43	377.17±36.86*
BME 125 HFD/STZ	225.17±49.46	398.50±97.14	524.33±28.274	531.50±30.06	377.17±57.09*
BME 250 HFD/STZ	181.67±14.77*	328.00±50.54	440.50±70.90**	467.47±60.30*	369.50±81.86*

The data are presented as means±SD of 6 independent rats. Statistical analyses were performed by Dunnett's test (control column=HFD/STZ) after one-way ANOVA and using SPSS software. *: $P<0.05$, **: $P<0.005$.

Table 4. Effect of bitter melon(*Momordica charantia*) extracts on HbA1c levels of HFD/STZ-induced diabetic rats

Group	HbA1c (%)
Normal	3.17±0.15
HFD/STZ	7.07±0.21
BME 62.5 HFD/STZ	6.57±1.36
BME 125 HFD/STZ	6.63±0.28
BME 250 HFD/STZ	6.53±1.10

The data are presented as means±SD of 6 independent rats.

3.4. 미숙여주주정추출분말 경구투여에 의한 당화혈색소 함량 변화

미숙여주주정추출분말의 경구투여로 인한 HFD/STZ rat의 당화혈색소의 변화를 Table 4에 나타내었다. BME 62.5 투여 HFD/STZ군의 당화혈색소 함량은 6.57±1.36%로 측정되어 HFD/STZ군의 7.07±0.21%에 비해 감소가 나타났으며, BME 125투여 HFD/STZ군과 BME 250 투여 HFD/STZ군에서도 각각 6.63±0.28%, 6.53±1.10%로 측정되어 통계적으로 유의하진 않지만 감소하는 경향을 보였다.

당화혈색소의 경우 당뇨병 진행을 나타내는 지표로 많이 사용되며 평균 농도가 1% 감소 시 심근경색, 뇌졸중 등 합병증 발생률이 약 14%, 미세혈관 질환 발생 위험이 약 37% 정도 감소하는 것으로 알려져 있다(Stratton et al., 2000). 이러한 결과는 여주를 섭취함으로써 당뇨합병증 발생의 위험도 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

3.5. 미숙여주주정추출분말 경구투여로 인한 췌장의 조직학적 변화

미숙여주주정추출분말의 경구투여로 인한 조직의 변

화를 알아 보기 위해 조직학적 검사를 진행하였다(Fig. 2). 조직학적 분석을 토대로 신출된 췌장섬의 수 및 직경, 효소원과립의 비율, insulin, glucagon 분비세포의 수 및 비율의 변화는 Table 5에 나타내었다. HFD/STZ 군의 경우 정상군과 비교하여 glucagon 분비 면역반응세포의 유의성 있는 수적변화를 동반하지 않고, 평균 췌장섬 수 및 직경, 외분비 단위 면적당 효소원 과립이 차지하는 비율, insulin 분비 면역반응세포의 수 및 insulin/glucagon 비율의 유의성 있는 감소 등 전형적인 HFD/STZ 유발 2형당뇨 관련 조직병리학적 변화 소견이 발견되었다. HFD/STZ 군에서 췌장섬의 수는 12.6±2.51 islets/cm²으로 나타났고 BME 62.5, 125, 250 투여 HFD/STZ 군에서는 각각 19.20±1.64 islets/cm², 20.40±2.51 islets/cm², 21.00±2.12 islets/cm²으로 나타나 유의적으로 증가함을 확인하였으며 췌장섬의 직경도 여주 투여로 인하여 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 제 2형 당뇨에 경우 전형적으로 효소원 과립의 감소가 보고 되었으며(Kim et al., 2018) 여주의 투여로 인해 유의적으로 효소원 과립의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 면역반응

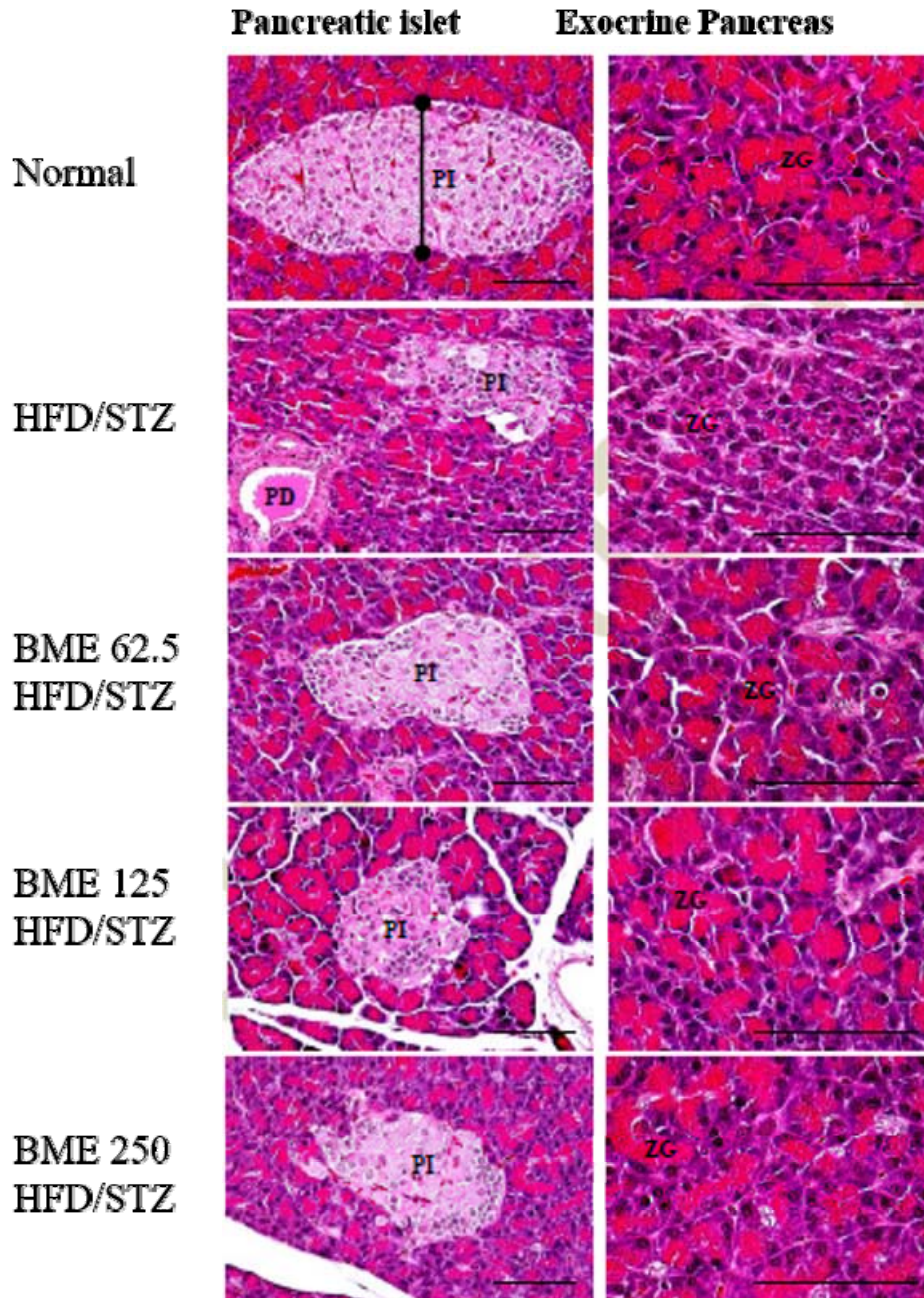


Fig. 2. The representative histopathological profiles of the pancreas - splenic lobe tissues, taken from Normal or HFD/STZ rats.

PI : Pancreatic islet, PD : Pancreatic ducts, ZG : Zymogen granules.

Scale bars = 80 μ m

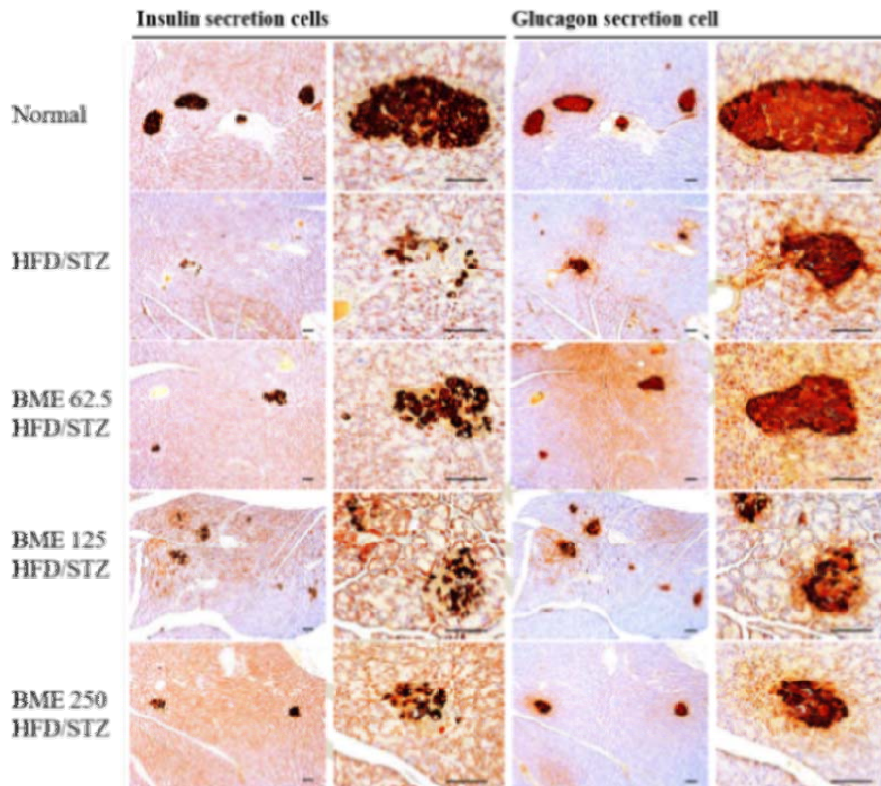


Fig. 3. The representative insulin and glucagon secretion immunostained profiles on the pancreas – splenic lobe tissues, taken from Normal or HFD/STZ rats.
Scale bars = 80 μ m

Table 5. Histomorphometrical analysis on the pancreas-splenic lobe tissues, taken from HFD/STZ-induced diabetic rats

Group	Pancreatic islets		Zymogen granules (%/mm ² of exocrine)	Immunoreactive cells		
	Numbers (islets/cm ²)	Diameters (μ m)		Insulin secretion (cells/mm ²)	Glucagon secretion (cells/mm ²)	Insulin/glucagon (ratios)
Normal	30.60 \pm 2.51	180.47 \pm 43.03	62.92 \pm 1.99	513.00 \pm 226.08	71.80 \pm 19.27	6.06 \pm 2.66
HFD/STZ	12.6 \pm 2.51	79.38 \pm 7.90	13.27 \pm 3.08	22.80 \pm 2.28	72.40 \pm 15.84	0.32 \pm 0.05
BME 62.5 HFD/STZ	19.20 \pm 1.64**	101.58 \pm 13.28*	29.59 \pm 6.93**	57.60 \pm 15.71**	71.60 \pm 9.63	0.80 \pm 0.12***
BME 125 HFD/STZ	20.40 \pm 2.51**	109.22 \pm 12.51**	34.17 \pm 7.25***	56.00 \pm 11.22***	71.80 \pm 21.38	0.83 \pm 0.27**
BME 250 HFD/STZ	21.00 \pm 2.12***	109.31 \pm 14.23**	34.61 \pm 9.27**	62.80 \pm 22.52**	76.40 \pm 14.99	0.84 \pm 0.30**

The data are presented as means \pm SD of 6 independent rats. Statistical analyses were performed by Dunnett's test (control column=HFD/STZ) after one-way ANOVA and using SPSS software. *: P <0.05, **: P <0.005, ***: P <0.001.

세포 수의 경우 여주 투여시 HFD/STZ군 대비 유의적으로 insulin 분비세포의 증가, insulin/glucagon의 비율 증가가 확인되었다. 이러한 조직학적 확인을 통해 여주의 투여가 췌장 소화효소 (효소원 과립) 분비 조절 및 insulin 분비 세포 보존 효과를 통해 2형 당뇨를 제어할 가능성을 확인하였다.

4. 결론

이전에 수행된 인체적용시험(IRB No. 1040549-201603-BM-004)에서 여주를 섭취한 시험군은 위약군과 비교하여 경구당부하 후 혈당과 인슐린, 글루카곤이 감소하였고 혈당과 글루카곤은 통계적인 유의성을 나타내었다. 여주를 활용한 항당뇨 효능연구에 있어서 그 기전으로 인슐린-식후혈당간의 관계는 널리 알려져 있으나 이와 같이 글루카곤과의 연관성을 보인 경우는 드물었기에 작용기전을 확인하고자 본 실험을 수행하였다. 그 결과 미숙여주주정추출분말 경구투여군은 경구당부하검사(OGTT) 120분과 곡선하면적(AUC)에서 유의적인 혈당감소를 보였으며, 글루카곤 또한 유도군 대비 유의적으로 감소하였음을 확인하였다. 이와 같은 내용을 토대로 볼 때, 미숙여주주정추출분말은 인체적용시험과 동물 모델을 통하여 글루카곤 분비 억제를 통한 혈당상승억제의 연관성을 확인하였으며 이는 글루카곤의 분비를 억제함으로써 혈당상승을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

REFERENCES

- Adeghate, E., Schattner, P., Dunn, E., 2006, An Update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1084, 1-29.
- Ahmed, I., Adeghate, E., Sharma, A. K., Pallot, D. J., Singh, J., 1998, Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat., *Diabetes. Res. Clin. Pract.*, 40, 145-151.
- Beloin, N., Gbeassor, M., Akpagana, K., Hudson, J., de Soussa, K., Koumaglo, K., Arnason, J. T., 2005, Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity., *J. Ethnopharmacol.*, 96, 49-55.
- Bhat, G. A., Khan, H. A., Alhomida, A. S., Sharma, P., Singh, R., Paray, B. A., 2018, GLP-1 secretion in healthy and diabetic Wistar rats in response to aqueous extract of *Momordica charantia*., *BMC Complement. Altern. Med.*, 18, 162.
- Consoli, A., 1992, Role of Liver in Pathophysiology of NIDDM., *Diabetes. Care.*, 15, 430-441.
- Elekofehinti, O. O., Ariyo, E. O., Akinijyan, M. O., Olayeriju, O. S., Lawal, A. O., Adanlawo, I. G., Rocha, J. B. T., 2018, Potential use of bitter melon(*Momordica charantia*) derived compounds as antidiabetics: In silico and in vivo studies. *Pathophysiology.*, 25, 327-333.
- Grover, J. K., Rathi, S. S., Vats V., 2002, Amelioration of experimental diabetic neuropathy and gastropathy in rats following oral administration of plant(*Eugenia jambolana*, *Mucuna pruriens* and *Tinospora cordifolia*) extracts. *Indian. J. Exp. Biol.*, 40, 273-276.
- Grover, J. K., Vats, V., Rathi, S. S., Dawar, R., 2001, Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.*, 76, 233-238.
- Grover, J. K., Yadav, S. P., 2004, Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review., *J. Ethnopharmacol.*, 93, 123-132.
- Jiang, G., Zhang, B. B., 2003, Glucagon and regulation of glucose metabolism., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284, E671-E678.
- Kim, J. W., Lee, Y. S., Seol, D. J., Cho, I. J., Ku, S. K., Choi, J. S., Lee, H. J., 2018, Anti-obesity and fatty liver-preventing activities of *Lonicera caerulea* in high-fat diet-fed mice. *Int. J. Mol. Med.*, 42, 3047-64.
- Kim, Y. J., Kim, H. K., Lee, H. S., 2018, Hypoglycemic effect of standardized *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice and rats., *Food. Sci. Biotechnol.*, 27, 1771-1779.
- Kyoung, S. P., 2018, DIABETES FACT SHEET IN KOREA. Korea Diabetes Association, Seoul, Korea.
- Lee, M. Y., Kim, M. K., Park, J. S., Lee, S. B., You, J. H., Ahn, C. W., Kim, K. R., Kang, S. N., 2019, Higher Glucagon-to-Insulin Ratio Is Associated With Elevated Glycated Hemoglobin Levels in Type 2 Diabetes Patients., *Korean. J. Intern. Med.*, 34, 1068-1077.
- Raman, A., Lau, C., 1996, Anti-diabetic properties phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae)., *Phytomedicine.*, 2, 349-362.

- Rathi, S. S., Grover, J. K., Vikrant, V., Biswas, N. R., 2002, Prevention of experimental diabetic cataract by Indian Ayurvedic plants extracts., *Phytother. Res.*, 16, 774-777.
- Shih, C. C., Shlau, M. T., Lin, C. H., Wu, J. B., 2014, *Momordica charantia* Ameliorates Insulin Resistance and Dyslipidemia with Altered Hepatic Glucose Production and Fatty Acid Synthesis and AMPK Phosphorylation in High-fat-fed Mice., *Phytother. Res.*, 28, 363-371.
- Son, H. S., 2008, Early Diagnosis of Diabetes Mellitus. *J. Korean. Med. Assoc.*, 51, 813-817.
- Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A. W., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C., Holman, R. R., 2000, Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.*, 321, 405-412.
- Vikrant, V., Grover, J. K., Tandon, N., Rathi, S. S., Gupta, N., 2001, Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. *J. Ethnopharmacol.*, 76, 139-143.
- Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malanier, C., Blazevic, T., Schwaiger, S., Rollinger, J. M., Heiss, E. H., Schuster, D., Kopp, B., Bauer, R., Stuppner, H., Dirsch, V. M., Atanasov, A. G., 2014, Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochem. Pharmacol.*, 92, 73-89.

-
- Researcher. Seong-Eun Kim
Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co. Ltd.
kse1316@kolmarbnh.co.kr
 - Researcher. Sang-Back Kim
Skin & Natural products Lab. Kolmar Korea Co. Ltd.
m302@kolmar.co.kr
 - Researcher. Seul-Ki Kim
Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co. Ltd.
lovesshot@kolmarbnh.co.kr
 - Researcher. Hyun-Kyu Kim
Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co. Ltd.
hkkim@kolmarbnh.co.kr
 - Researcher. Byoung-Jun Park
Skin & Natural products Lab. Kolmar Korea Co. Ltd.
A2001@kolmar.co.kr
 - Researcher. Hak-Sung Lee
Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co. Ltd.
mildpeople@kolmarbnh.co.kr