

Research Article



OPEN ACCESS

Received: Dec 30, 2022
Revised: Jan 27, 2023
Accepted: Jan 30, 2023
Published online: Feb 20, 2023

Correspondence to

Eunjung Kim

Department of Food Science and Nutrition,
Daegu Catholic University, 13-13 Hayang-ro,
Hayang-eup, Gyeongsan 38430, Korea.
Tel: +82-53-850-3523
Email: kimeunj@cu.ac.kr

© 2023 The Korean Nutrition Society

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.

ORCID iDs

Eunyeong Ahn
<https://orcid.org/0000-0003-2196-379X>
Sujin Shin
<https://orcid.org/0000-0003-1370-2530>
Sang-Won Choi
<https://orcid.org/0000-0002-1603-0576>
Eunjung Kim
<https://orcid.org/0000-0003-4548-2632>

Funding

This work was supported by research grants from Daegu Catholic University in 2020.

Streptozotocin 유도 당뇨 마우스에서 상지 물추출물의 이당류 분해효소활성 억제를 통한 항당뇨 효능

안은영 , 신수진 , 최상원 , 김은정

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Antidiabetic effects of water extracts of mulberry (*Morus alba* L.) twig by inhibition of disaccharidase activity in streptozotocin-induced diabetic mice

Eunyeong Ahn , Sujin Shin , Sang-Won Choi , and Eunjung Kim

Department of Food Science and Nutrition, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

ABSTRACT

Purpose: The prevalence of diabetes mellitus (DM) continues to increase worldwide, and blood glucose control may reduce mortality from diabetic complications and healthcare costs. Mulberry twig (MT) has been used as a herbal medicine in Asia, and its antidiabetic efficacy has recently been reported, but research in this area is still limited. This study examined the antidiabetic effects of water extracts of MT in diabetic animals.

Methods: Six weeks old male ICR mice were divided randomly into three groups; normal control (NC, n = 10), DM control (DC, n = 10), and MT (n = 10). Streptozotocin (STZ, 50 mg/kg/day) was injected intraperitoneally into mice in the DC and MT groups for 5 consecutive days. After 10 days of the last STZ injection, the mice in the MT group were administered orally with MT water extracts (5 g/kg body weight) for 16 days.

Results: The MT water extracts ameliorated the swelling of the liver in the diabetic mice and reduced the elevated levels of fasting blood and plasma glucose, total cholesterol (T-CHO), low density lipoprotein-CHO, and the ratio of high density lipoprotein (HDL)-CHO/T-CHO. The liver triglyceride (TG) and glycogen contents were also significantly lower in the MT group mice than in the DC group. The small intestine disaccharidase activity was analyzed to understand the therapeutic effects and the mechanism of MT water extracts in diabetic animals. MT group mice showed reduced lactase and sucrase activity in the proximal part of the small intestine. On the other hand, body weight, plasma insulin, TG, HDL-CHO, and hepatic T-CHO levels were similar in the DC and MT groups.

Conclusion: These results suggest that MT water extracts have antidiabetic effects and can be developed as a functional source to reduce the postprandial blood glucose or to prevent DM incidence.

Keywords: diabetes mellitus, type 1; *Morus alba* L.; mulberry twig; streptozotocin; disaccharidase

서론

우리나라 30세 이상 당뇨병 유병율은 13.6%로 사망률은 인구 십만명당 17.5명에 이르며 심혈관계질환, 당뇨병성 신증 등 당뇨 합병증으로 인한 사망이 주를 이룬다 [1]. 당뇨병 환자의 삶의 질을 높이고 사망률을 줄이기 위해서 평소의 혈당관리가 무엇보다 중요한데, 식사와 운동으로 혈당조절이 잘 되지 않는 환자들에게 사용되는 약물들은 저혈당증, 인슐린 분비능 상실, 심부전, 간부전 등의 부작용으로 인해 저용량으로 사용해야하는 제한점이 있다 [2]. 상지 (Mulberry twig, MT)는 뽕나무 (*Morus alba* L.)의 가지로 예로부터 당뇨, 관절, 기침을 비롯한 여러 가지 질병에 효과가 있다고 알려져 왔는데, 동의보감과 본초강목에는 특히 당뇨병과 풍에 효능이 있다고 기록되어 있다 [3]. 상지에는 항당뇨, 항고지혈증, 항비만, 항염증 및 항산화성 mulberroside A, oxyresveratrol 등의 resveratrol 유도체와 moracin 유도체, 알칼로이드 및 다당류가 존재함이 보고된 바 있다 [4,5]. 최근 동물실험에서 상지는 alloxan과 streptozotocin (STZ) 유도 당뇨쥐에서 공복혈당을 낮추고 [6,7], 당뇨로 인한 체중감소, 간비대, 인슐린 저항성, 그리고 이상지질혈증을 개선시키는 효과가 있는 것으로 나타났다 [7,8]. 또한 STZ로 손상된 췌도 세포 (islet cells)의 회복과 인슐린 분비능을 개선시키고 [7-9], 식후혈당상승을 억제하는 효과가 보고되었다 [10-13].

한편, 본 연구진은 최근 상지주정추출물이 세포실험, 동물실험 및 인체적용시험에서 항당뇨 효능이 있는 것으로 확인하였으며 [10,14], 그 결과 식품의약품안전처 개별인정형 혈당 조절에 도움을 주는 기능성 원료로 인증을 받았다 [15]. 그러나 상지주정추출분말은 타블렛, 캡슐, 환 등의 기능성 제형으로 제조하여 활용하는 데는 우수하나, 간편하게 우려 마실 수 있는 건강차로서 널리 활용하는 데 제한이 있다. 따라서 상지를 간단히 가공처리 후 차나 음료로 쉽게 제조하여 섭취할 수 있는 상지 물추출물의 항당뇨 효능을 연구할 필요가 있다.

본 연구에서는 상지 물추출물의 항당뇨 효능을 확인하기 위해 STZ 유발 당뇨 마우스를 이용하여 상지 물추출물의 혈장 포도당과 혈중 지질 및 소장 이당류 분해효소 활성에 미치는 효능을 살펴보고 향후 상지를 이용한 기호차나 음료 개발의 기초자료를 마련하고자 하였다.

연구방법

상지 물추출물의 제조

상지는 봄에 잎이 내돋지 않은 때에 뽕나무로부터 채취 후 1주일간 음건한 다음 50°C 이하 열풍건조기 (COBP-15S, Sjinheung hot air dryer; Sjinheung, Boryeong, Korea)에서 건조한 것을 공시재료로 사용하였다. 건조한 상지 (200 g)에 이온수 1L를 가하여 초음파추출기 (Power Sonic 420; Hwashin Tech Co. Ltd., Gwangju, Korea)에서 2시간 동안 2회 반복하여 추출한 후 여과 및 감압 농축하여 상지 물추출물 (10.5 g)을 얻어 실험에 사용하였다.

동물실험

수컷, 6주령 ICR 마우스를 코아텍 바이오 (Busan, Korea)에서 구입하여 1주 동안 적응시킨 후, 3군으로 분류하였다: 정상대조군 (normal control, NC, n = 10); 당뇨대조군 (diabetic control, DC, n = 10); 상지 물추출물투여군 (MT, n = 10). DC군과 MT군은 STZ (50 mg/kg; Sigma Chem-

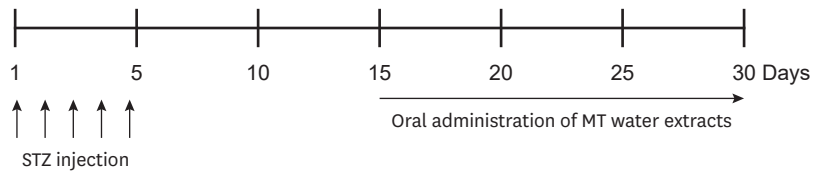


Fig. 1. Schematic representation of experiment of MT water extracts in type 1 diabetes animal model. Male ICR mice were injected with STZ for 5 times (50 mg/kg BW/day). MT water extracts (5 g/kg BW/day) were orally administrated to mice for 16 days after 10 days of the last STZ injection. STZ, streptozotocin; MT, Mulberry twig; BW, body weight.

ical, St. Louis, MO, USA)를 1일 1회 5일간 복강주사하였다 (Fig. 1). 경구투여는 STZ 투여 마지막일로부터 10일 후 당뇨 유발을 확인한 뒤 1일 1회 총 16일간 투여하였으며, NC군과 DC군은 멸균식염수를, MT군은 상지 물추출물 (5 g/kg body weight [BW])을 투여하였다. 실험동물은 12시간 명암주기를 유지하고, 항온 (25 ± 2°C), 항습 (50 ± 5%) 환경에서 사육하였다. 실험기간 중 식이는 일반 고형사료로 제공하였고 식이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 주 2회 체중을 측정하였다. 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회 승인 (IACUC-2015-022)을 얻어 수행하였다.

혈액 포도당 및 지질 농도 분석

실험기간 중 혈당측정은 미정맥으로부터 소량의 혈액을 채취하여 혈당계 (blood glucose monitoring kit; ARKRAY, Inc., Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 실험동물은 CO₂로 마취시킨 후 헤파린 (2,000 IU/mL) 처리된 주사기를 사용하여 복부 대정맥으로부터 채혈하였다. 혈액은 4°C에서 3,000 × g의 속도로 15분간 원심분리를 통해 혈장을 분리하였다. 혈장 포도당, triglyceride (TG), total-cholesterol (T-CHO), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-CHO) 농도는 각각의 측정용 시액 (Asan kit; Asanpharm, Seoul, Korea)을 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 측정하였다. Low density lipoprotein-cholesterol (LDL-CHO)농도는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$LDL-CHO = (T-CHO) - (HDL-CHO) - (0.2 \times TG)$$

혈장 인슐린은 mouse Insulin ELISA KIT (U-type) (Shibayagi Co., Ltd. Gunma, Japan)를 사용하여 측정하였고 시료는 마우스 인슐린 표준용액 (0.5 mg/dL)과 비교하여 정량하였다.

간 조직 지질 분석

간 조직 0.5 g에 10 mL의 CHCl₃:CH₃OH (2:1, v/v) 용액을 가한 후 균질화하여 여과한 다음 질소 농축기로 농축시켰다. 다시 1 mL의 CHCl₃:CH₃OH (2:1) 용액에 녹인 후 100 µL를 취하여 질소 농축기로 농축시킨 다음 1 mL의 ethanol에 녹여 그 중 0.2 mL를 시료로 사용하였다. 0.2 mL의 시료에 0.5% Triton X-100와 3 mM sodium cholate가 포함된 효소시액 0.5 mL를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 각각 글리세롤 표준용액 (300 mg/dL) 및 CHO 표준용액 (50 mg/dL)과 비교하여 정량하였다.

간 조직 글리코겐 분석

글리코겐 함량은 Seifter 등 [16]의 방법을 수정하여 측정하였다. 간 조직 0.1 g당 30% KOH 용액을 1 mL 넣고 균질화하여 시료로 사용하였다. 균질화된 시료를 100°C에서 30분간 반응시

킨 후 95% ethanol 1 mL를 가하고 4°C에서 over-night 하였다. 다음 날 4°C, 5,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버리고 pellet만 취하였다. 1 mL의 dH₂O로 pellet을 녹인 후 200 μL씩 소분하고, anthrone 시약 (0.2 g anthrone/100 mL 95% H₂SO₄) 600 μL를 가한 후 100°C에서 20분간 반응시켜 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

소장 이당류분해효소 활성 측정

소장 점막층의 lactase, sucrase 및 maltase활성은 Dahlqvist의 방법 [17]에 따라 측정하였다. 실험동물을 희생한 직후 위의 유문괄약근에서 10 cm 떨어진 지점부터 맹장 직전까지 자른 후 같은 길이로 세 등분하여 proximal, middle, distal 부분으로 구분하고, 절개한 후 각각 차게 냉장시킨 생리식염수로 깨끗하게 씻어 거즈로 수분을 제거하였다. 얼음 위 냉각판에서 점막을 microscopic glass로 긁어서 무게를 측정하고 4배의 증류수를 가하여 homogenizer로 균질화시켰다. 균질액은 4°C, 7,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취해 효소활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 희석시킨 효소 시료 (lactase: 1배 희석, sucrase: 8배 희석, maltase: 10배 희석) 0.1 mL와 0.056 M disaccharide solution/0.1 M sodium lactate buffer (pH 6.0) 0.1 mL를 시험관에 넣고 잘 혼합해서 37°C에서 60분간 반응시킨 후 증류수 0.8 mL를 가하고 2분간 끓는 물에 담근 후 식혔다. 시료용액 0.5 mL에 glucose oxidase 용액 3 mL를 혼합한 후 37°C에서 1시간 반응시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이당류분해효소 활성도는 specific activity (units of activity/mg protein)로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS (ver. 19; IBM, Armonk, NY, USA) 통계 처리 프로그램을 사용하여, 평균값 ± 표준오차 (standard error)로 나타내었다. 군별 유의성 검증은 analysis of variance test를 통해 분석하였고, 유의한 차이가 있는 경우 유의 수준 $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 사후검증을 실시하였다.

결과

체중 변화 및 장기 무게

실험 시작 시 체중은 각 군 간에 유의한 차이가 없었으며, 실험 종료 직전 측정된 마지막 체중은 NC군에 비하여 당뇨를 유발한 DC군과 MT군에서 모두 유의적으로 감소하였다 (Table 1). 간 무게는 NC군에 비해 DC군에서 증가하였으며, MT군의 간 무게는 NC군과 유사한 수준으로 감소하였다. 부고환지방량은 NC군에 비하여 DC군과 MT군에서 현저히 감소하였으나 자미근의 무게는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.

혈당 및 인슐린 농도

상지 물추출물 경구투여 10일 경과 후 측정된 공복혈당은 DC군의 혈당이 270.4 mg/dL로 STZ에 의한 당뇨가 유발되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). MT군의 공복혈당은 172.3 mg/dL로 DC군에 비해 64% 감소하였다. 혈장 포도당 농도도 NC군 (137.8 mg/dL)에 비하여 DC군 (281.7 mg/dL)에서 유의적으로 증가하였고, MT군 (121.0 mg/dL)의 혈당은 NC군 수준으로 감소하였다 (Fig. 2B). 혈장 인슐린농도는 NC군에 비하여 DC군과 MT군에서 감소하였으며 DC군과 MT군 간의 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 2C).

Table 1. Effects of MT water extracts on BW and organ weights in diabetic mice

Group	Initial BW (g)	Final BW (g)	Liver (g/kg BW) ¹⁾	Epididymal fat (g/kg BW)	Soleus muscle (g/kg BW)
NC	34.00 ± 0.28 ^{NS}	39.48 ± 0.54 ^a	42.20 ± 0.44 ^b	11.23 ± 1.31 ^a	0.59 ± 0.04 ^{NS}
DC	34.87 ± 0.38	33.32 ± 1.11 ^b	53.77 ± 1.93 ^a	2.88 ± 0.78 ^b	0.57 ± 0.05
MT	34.56 ± 0.32	33.90 ± 0.89 ^b	43.12 ± 1.49 ^b	2.65 ± 0.98 ^b	0.58 ± 0.04

Values are presented as the mean ± standard error.

NC, normal control; DC, diabetic control; MT, Mulberry twig; BW, body weight; NS, not significant.

¹⁾Organ weight of liver, epididymal fat, soleus muscle was measured. The ratio between the organ absolute weight and body weight represents the relative organ weight.

Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

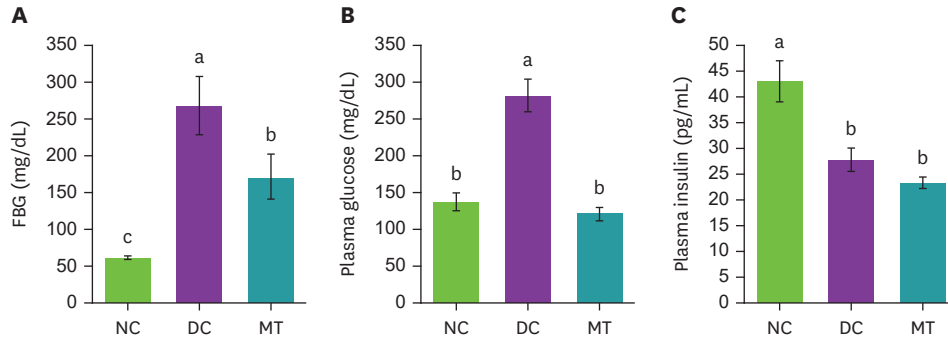


Fig. 2. Effects of MT water extracts on the levels of blood glucose and insulin in diabetic mice.

Male ICR mice in DC and MT groups were intraperitoneal injected with STZ (50 mg/kg BW) for 5 consecutive days. When the diabetes induction was verified, the mice in MT group were orally administered with MT water extracts (5 g/kg BW) for 16 days. The levels of (A) FBG, (B) fasting plasma glucose, and (C) plasma insulin were measured. Values are presented as the mean ± standard error.

NS, not significant; NC, normal control; DC, diabetic control; MT, Mulberry twig; FBG, fasting blood glucose; BW, body weight; STZ, streptozotocin.

Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

혈장 지질 수준

혈장 TG 농도는 NC군 (106.4 mg/dL)에 비해 DC군 (72.0 mg/dL)과 MT군 (79.8 mg/dL)에서 모두 감소하였으며 (Fig. 3A), 혈장 T-CHO 농도는 NC군이 157.5, DC군이 170.8, MT군이 122.5 mg/dL로 MT군의 T-CHO수준이 DC군에 비하여 72% 수준으로 감소하였다 (Fig. 3B). 혈장 HDL-CHO 농도는 NC군에 비해 당뇨 유발군에서 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 3C). 그러나, T-CHO 대비 HDL-CHO의 비는 NC군에 비해 DC군에서 감소한 반면, MT군에서는 NC군 수준으로 증가하였다 (Fig. 3D). 혈장 LDL-CHO 농도는 NC군이 94.9, DC군이 122.3, MT군이 79.1 mg/dL로 MT군의 LDL-CHO수준이 DC군의 65% 수준으로 감소하였다 (Fig. 3E).

간 조직 지질 및 글리코겐 수준

상지 물추출물의 급여가 당뇨 마우스의 간 조직 지질 및 당대사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 간 조직 지질 및 글리코겐 수준을 분석하였다. 간 조직 TG 함량은 NC군 (9.5 mg/g liver)에 비하여 DC군 (19.4 mg/g liver)에서 204% 증가하였고, MT군의 TG (8.5 mg/g liver)는 NC군 수준으로 감소하였다 (Fig. 4A). T-CHO량은 NC군이 2.6, DC군이 2.9, MT군이 2.5 mg/g liver로 DC군에 비하여 MT군에서 감소하여 혈중 T-CHO 농도와 같은 경향을 보였으나 군 간 유의한 차이는 없었다 (Fig. 4B). 간 조직 글리코겐 함량은 NC군 (94.7 mg/g liver)에 비하여 DC군 (503.2 mg/g liver)에서 532% 증가하였고 MT군의 글리코겐 함량은 63.1 mg/g liver로 NC군 수준으로 감소하였다 (Fig. 4C).

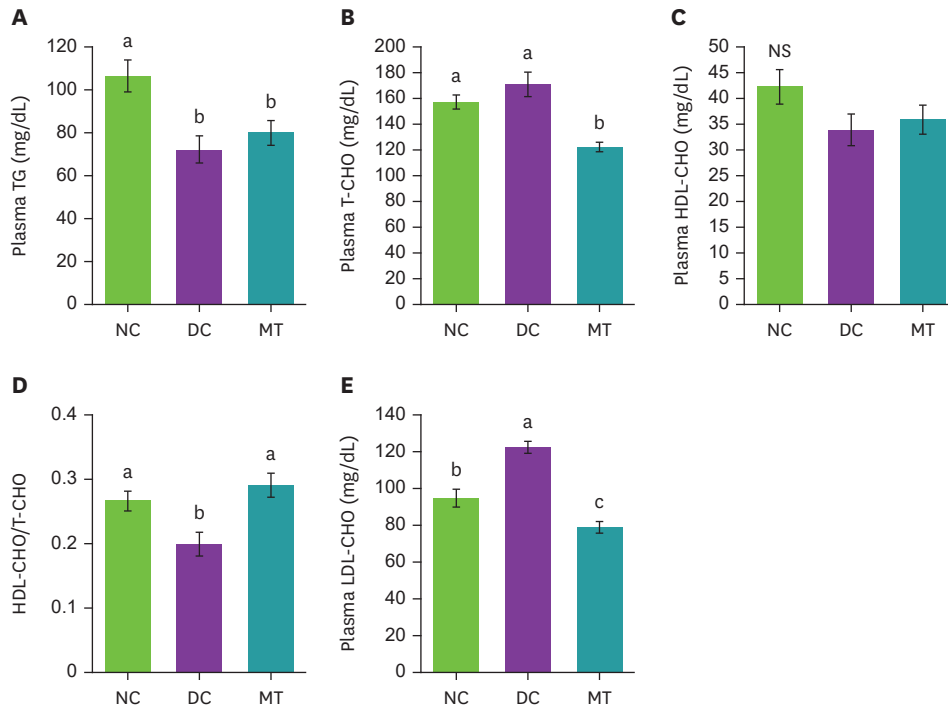


Fig. 3. Effects of MT water extracts on the levels of plasma lipids in diabetic mice.

Male ICR mice in DC and MT groups were intraperitoneal injected with STZ (50 mg/kg BW) for 5 consecutive days. When the diabetes induction was verified, the mice in MT group were orally administered with MT water extracts (5 g/kg BW) for 16 days. The levels of plasma (A) TG, (B) T-CHO, (C) HDL-CHO were analyzed. (D) HDL-CHO/T-CHO ratio and the level of (E) LDL-CHO were calculated. Values are presented as the mean ± standard error.

NS, not significant; NC, normal control; DC, diabetic control; MT, mulberry twig; BW, body weight; TG, triglyceride; T-CHO, total-cholesterol; HDL-CHO, high density lipoprotein-cholesterol; LDL-CHO, low density lipoprotein-cholesterol; STZ, streptozotocin. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

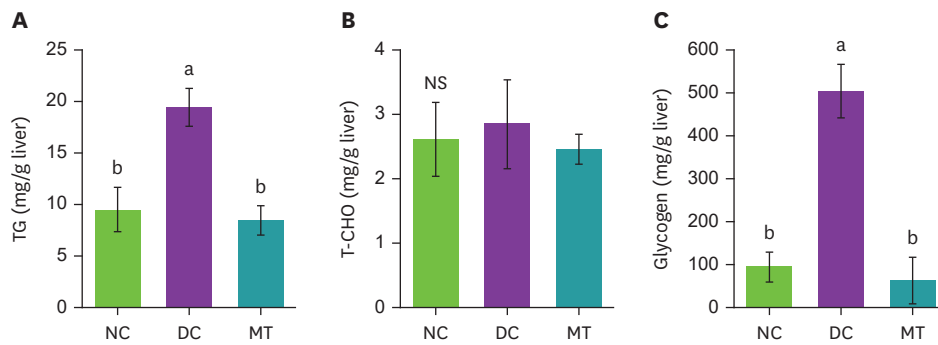


Fig. 4. Effects of MT water extracts on the hepatic lipids and glycogen contents in diabetic mice.

Male ICR mice in DC and MT groups were intraperitoneal injected with STZ (50 mg/kg BW) for 5 consecutive days. When the diabetes induction was verified, the mice in MT group were orally administered with MT water extracts (5 g/kg BW) for 16 days. The contents of hepatic (A) TG, (B) T-CHO, and (C) glycogen were analyzed. Values are presented as the mean ± standard error.

BW, body weight; NS, not significant; NC, normal control; DC, diabetic control; MT, Mulberry twig; TG, triglyceride; T-CHO, total-cholesterol; STZ, streptozotocin. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

소장 이당류 분해효소 활성

상지 물추출물이 포도당 흡수에 미치는 영향을 분석하기 위하여 소장을 proximal, middle, distal의 세 부분으로 구분하고, 각 부분에서 이당류 분해효소인 lactase, sucrase, maltase의 활성을 측정하였다. Proximal 부분에서 lactase의 활성은 MT군이 가장 낮았으며, 그 활성은 DC

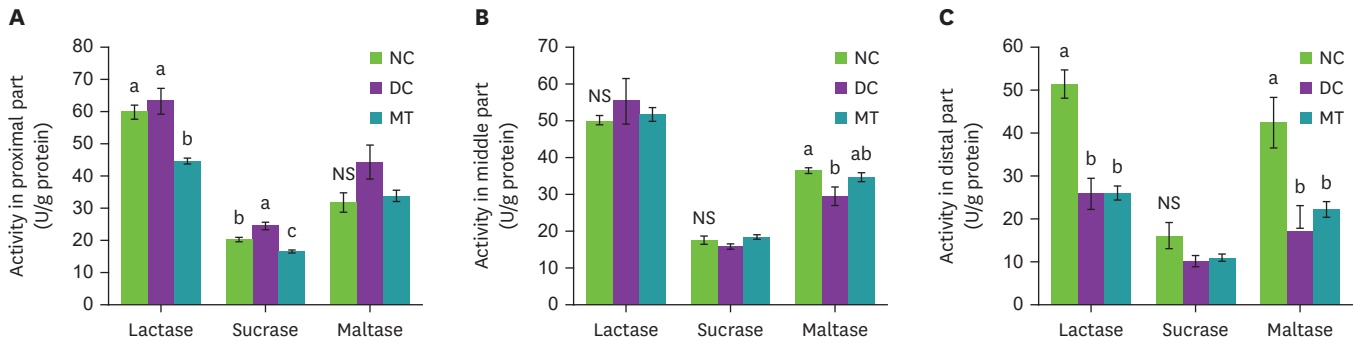


Fig. 5. Effects of MT water extracts on intestinal disaccharidase activity in diabetic mice.

Male ICR mice in DC and MT groups were intraperitoneal injected with STZ (50 mg/kg BW) for 5 consecutive days. When the diabetes induction was verified, the mice in MT group were orally administered with MT water extracts (5 g/kg BW) for 16 days. The activities of lactase, sucrase and maltase in the (A) proximal, (B) middle, and (C) distal part of small intestine were analyzed. Disaccharidase activity was expressed as U(enzyme unit)/g protein. Values are presented as the mean ± standard error.

BW, body weight; NS, not significant; NC, normal control; DC, diabetic control; MT, Mulberry twig; STZ, streptozotocin. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

군의 70% 수준으로 나타났다 (Fig. 5A). Sucrase 활성은 NC군에 비해 DC군에서 122% 증가하였으며, DC군에 비해 MT군에서는 67% 수준으로 감소하였다. Maltase 활성은 NC군에 비해 DC군에서 140% 증가하였으며, MT군에서 76% 수준으로 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 경향은 DC군에 비하여 MT군의 혈장 포도당 농도가 크게 감소한 결과와도 일치한다. Middle 부분에서는 lactase와 sucrase 활성에 있어 각 군 간의 유의적인 차이는 없었으며, maltase 활성은 NC군에 비하여 DC군에서 감소하였다 (Fig. 5B). Distal 부분의 lactase, sucrase, maltase 활성은 NC군에 비해 DC군과 MT군에서 모두 감소하였다 (Fig. 5C).

고찰

최근 대한당뇨병학회에서 발표한 자료에 따르면 우리나라 당뇨병 인구는 605만명으로 30세 이상 성인 7명중 1명이 당뇨병을 앓고 있는 것으로 나타났으며, 당뇨병 고위험군인 당뇨병 전 단계 인구는 1,500만명에 달하는 것으로 추산되고 있다 [18]. 당뇨병 환자는 혈당 관리를 하지 않을 경우, 암, 심근경색, 허혈뇌졸중과 같은 주요 합병증으로 사망할 위험이 당뇨병이 없는 사람보다 평균 55% 높은 것으로 보고되고 있어 당뇨 환자의 혈당 관리를 위한 다양한 약제 및 기능성 식품개발에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 본 연구에서는 국내 자생 뽕나무 가지의 물추출물이 STZ 유도 당뇨 마우스에서 혈당 및 지질농도를 개선시키고, 소장 이당류 분해효소 활성을 억제하는 효능이 있음을 처음으로 보고하는 바이다.

STZ 당뇨모델에서는 췌장 손상으로 인한 인슐린 분비능 감소로 지방과 근육분해로 인한 체중감소가 나타난다 [19]. 상지 껍질 주정추출물을 STZ 유도 당뇨쥐에게 3주간 경구투여하였을 때 투여농도에 비례하여 당뇨에 의한 체중감소와 간 무게 증가가 완화되었고 [7], 상지 열풍건조분말을 식이에 혼합하여 마우스에 2주간 급여한 후 STZ로 당뇨를 유발한 실험에서도 상지 투여량에 의존적으로 STZ에 의한 체중감소와 간 비대 개선 효과가 보고된 바 있다 [8]. 그러나, 본 연구에서는 MT군의 체중 개선에 대한 효과는 나타나지 않았는데 이는 아마도 상지 원산지 및 추출방식 차이에 의한 것으로 사료된다 [4].

상지의 혈당 강하 및 지질농도 개선 효능은 여러 동물모델연구에서도 확인이 되고 있는데 Ye 등 [6]의 연구에서 상지 물추출물이 정상 대조군과 alloxan 유도 당뇨 쥐에서 공복 혈당과 임의 혈당을 농도 의존적으로 낮추었으며 두 동물모델에서 정상 식이 혹은 고에너지식이 상지 물추출물을 혼합하여 2주간 급여하였을 때도 당뇨쥐의 공복 혈당과 임의 혈당이 감소하였다. 본 연구에서 동물에게 투여한 물추출물의 양은 5 g/kg BW로 본 연구진을 비롯한 Ye 등 [6]의 선행연구 결과, 안전하면서도 가장 효과적인 농도로 판단되었으며 향후 상지를 이용한 상지차 또는 건강 음료로 개발하였을 때 매일 여러 잔을 마실 수 있는 것 또한 감안하여 정하였다. 상지 주정추출물의 경우 투여도 STZ 유도 당뇨쥐의 공복 혈당을 농도 의존적으로 감소시키고 인슐린 민감도와 이상지질혈증을 개선하였는데 [7,14] 상지 주정추출물의 주된 생리활성물질은 oxyresveratrol (*trans*-2',3,4',5-tetrahydroxystilbene), resveratrol 및 moracin [4]으로 oxyresveratrol의 혈당 강하 효과는 metformin과 유사한 수준이었다 [14]. 최근에는 상지의 주된 알칼로이드 (1-deoxynojirimycin (DNJ), famonime, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol) 성분이 STZ 유도 당뇨 동물모델에서 공복 혈당과 혈중 TG, 그리고 CHO 농도를 감소시키는 것으로 보고되었다 [12,13]. 본 연구에서 사용한 상지는 어린 가지 (twig)로 물추출물에는 배당체 형태의 moracin 유도체와 다당류가 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 [4].

한편, 상지 알칼로이드 [12]와 다당류 [9]는 당뇨군에 비해 혈장 insulin 농도와 췌장 랑게르한스섬 세포수를 증가시키는 효과도 나타났는데 이는 췌장 조직의 염증 반응과 산화적 스트레스 억제에 의한 것으로 보인다 [9]. Liu 등 [7]은 상지 껍질 주정추출물을 STZ 유발 당뇨쥐에 3주간 급여하였을 때 추출물 함량에 비례하여 간의 지방구 축적과 간 및 췌장 세포 손상이 감소됨을 보고한 바 있다. 본 연구에서 MT군의 인슐린 농도는 DC군과 비교하여 변화가 없었는데 이는 STZ에 의한 췌장 랑게르한스섬 세포의 손상 정도에 따라 다른 결과일 것으로 추측된다 [20]. 그러나, 상지 물추출물은 당뇨로 인한 간 조직 TG 및 글리코겐 축적 개선에는 효과를 보였다. 한편, STZ 유도 당뇨쥐에서 간 조직의 글리코겐 함량은 정상 대조군에 비해 감소하는 것으로 알려져 있는데 [21,22], 특이하게도 본 연구에서는 간 조직 글리코겐 함량이 NC군에 비하여 DC군에서 유의하게 증가하였다. Alloxan 유도 당뇨쥐에서 간의 글리코겐 합성효소 (glycogen synthase) 활성이 당뇨병 지속기간이 길어질수록 증가하였다는 보고들 [23-26]도 있어 당뇨 상태에서는 글리코겐 합성과 분해의 turnover 이상이 발생하는 것으로 보이며 상지 물추출물은 당뇨유발에 따른 글리코겐 대사이상을 개선하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

상지 물추출물은 proximal 부분의 이당류 분해효소인 sucrase 및 lactase 활성을 크게 감소시켰는데, 이러한 현상이 proximal 부분에서 나타난 것은 이당류가 공장 앞부분에서 단당류로 분해되어 흡수되기 때문인 것으로 생각된다. 정상군에 비해 당뇨를 유발한 마우스의 lactase, sucrase, maltase 효소 활성이 공장에서 증가했으며 [27], 고지방식을 급여한 C57 비만쥐에서 상지 알칼로이드 투여군의 sucrase와 maltase 활성이 억제되는 것이 보고된 바 있다 [13]. 특히 상지 알칼로이드의 주된 성분인 1-DNJ는 α -glucosidase 저해제로 포도당 흡수를 지연시키고 혈당 수준을 유의적으로 감소시키는 것으로 알려져 있는데 [28-30], 이중 맹검 임상시험에서 24주간 상지 알칼로이드 타블렛을 급여하였을 때, HbA1c와 식후 혈당 수준이 α -glucosidase 억제제인 acarbose 급여군 수준으로 감소한 반면 위장관 부작용 발생이 acarbose군의 15% 정도밖에 되지 않았다 [11]. 상지 주정추출물도 α -glucosidase 저해제로서 alloxan 유도 당뇨쥐에서 acarbose와 유사한 수준으로 고혈당과 당뇨 합병증에 대한 개선 효과를 보였으며 [6,31,32]

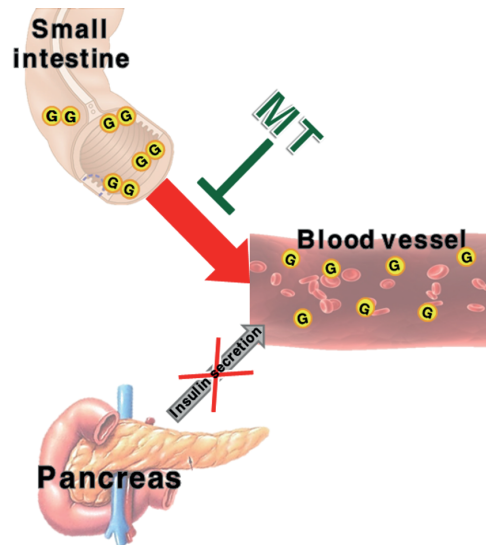


Fig. 6. A proposed mechanism on the antidiabetic effect of MT water extracts.

When pancreatic insulin secretion is deficient by streptozotocin, MT water extracts decreases the levels of blood glucose by inhibition of disaccharidase activity in the small intestine.
MT, Mulberry twig; G, glucose.

in vitro 실험에서 sucrase와 maltase 활성을 억제하였다 [33]. 상지 물추출물 또한 소장 이당류 분해효소 활성 억제를 통해 당의 흡수 속도를 늦춤으로써 식후 급격한 혈당상승과 이에 따른 인슐린의 과다 분비를 억제할 수 있음을 제시한다 (Fig. 6). 그러나, 인슐린 분비 감소와 간 글리코겐 합성 감소와의 관계가 DC군과 MT군에서 일치하지 않는 점은 본 연구결과만으로 설명하기 어려워 향후 추가적으로 연구할 필요가 있다. 한편, STZ 투여 전 상지분말식이를 2주간 마우스에 급여한 실험에서 공복혈당 상승과 췌장 손상이 억제되었을 뿐만 아니라 2형 당뇨병 발생율이 억제되었다는 연구결과 [8]는 상지가 혈당 조절뿐만 아니라 당뇨예방에도 효과가 있는 것으로 보인다.

요약

상지 물추출물의 투여는 STZ 유도 당뇨 마우스의 공복 혈당, 혈중 총 CHO, LDL-CHO, 간 무게 및 간 조직 TG를 NC군 수준으로 감소시키고 혈장 총 CHO 대비 HDL-CHO비는 NC군 수준으로 증가시켰으며, 소장 proximal region의 이당류 분해효소인 lactase, sucrase 활성을 억제하였다. 이는 상지를 차로 우려내어 음용할 경우 당뇨 예방 및 증상 개선의 가능성을 기대해 볼 수 있음을 제시한다. 상지는 국내산 뽕나무 부산물로 대량 생산될 뿐만 아니라 식품의 원료로 사용이 가능한 소재이므로 향후 상지 물추출물의 생리활성성분 분리 및 혈당조절기전 연구를 보다 깊이 수행한다면 안전하고 효과적인 고부가가치 혈당조절 기능성식품 개발의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Statistics Korea. Causes of death statistics in 2020 [Internet]. Daejeon: Statistics Korea; 2020 [cited 2022 Sep 27]. Available from: <http://kostat.go.kr>.
2. Van Gaal L, Scheen A. Weight management in type 2 diabetes: current and emerging approaches to treatment. *Diabetes Care* 2015; 38(6): 1161-1172.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Lee WJ. Status and prospect of development of high value-added uses of latent products. *J Sericult Entomol Sci* 1994; 36(2): 168-175.
4. Choi SW, Lee YJ, Ha SB, Jeon YH, Lee DH. Evaluation of biological activity and analysis of functional constituents from different parts of mulberry (*Morus alba* L.) tree. *J Korean Soc Food Sci Nutrition* 2015; 44(6): 823-831.
[CROSSREF](#)
5. Jeon YH, Choi SW. Validation of an analytical method of oxyresveratrol for standardization of mulberry (*Morus alba* L.) branch extract as a functional ingredient. *Korean J Food Sci Technol* 2018; 50(4): 377-382.
[CROSSREF](#)
6. Ye F, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb (*Ramulus mori*) in normal and diabetic rats and mice. *Phytomedicine* 2002; 9(2): 161-166.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Liu HY, Fang M, Zhang YQ. In vivo hypoglycaemic effect and inhibitory mechanism of the branch bark extract of the mulberry on STZ-induced diabetic mice. *Sci World J* 2014; 2014: 614265.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Liu HY, Wang J, Ma J, Zhang YQ. Interference effect of oral administration of mulberry branch bark powder on the incidence of type II diabetes in mice induced by streptozotocin. *Food Nutr Res* 2016; 60(1): 31606.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Guo C, Li R, Zheng N, Xu L, Liang T, He Q. Anti-diabetic effect of *Ramulus mori* polysaccharides, isolated from *Morus alba* L., on STZ-diabetic mice through blocking inflammatory response and attenuating oxidative stress. *Int Immunopharmacol* 2013; 16(1): 93-99.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Park SY, Jin BR, Lee YR, Kim YJ, Park JB, Jeon YH, et al. Postprandial hypoglycemic effects of mulberry twig and root bark in vivo and in vitro. *J Nutr Health* 2016; 49(1): 18-27.
[CROSSREF](#)
11. Li M, Huang X, Ye H, Chen Y, Yu J, Yang J, et al. Randomized, double-blinded, double-dummy, active-controlled, and multiple-dose clinical study comparing the efficacy and safety of mulberry twig (*Ramulus mori*, Sangzhi) alkaloid tablet and acarbose in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016: 7121356.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Liu Q, Liu S, Cao H, Ji W, Li C, Huan Y, et al. *Ramulus mori* (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) ameliorate glucose metabolism accompanied by the modulation of gut microbiota and ileal inflammatory damage in type 2 diabetic KKAY mice. *Front Pharmacol* 2021; 12: 642400.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Liu SN, Liu Q, Sun SJ, Li CN, Huan Y, Chen YT, et al. Anti-diabetic effects of the fraction of alkaloids from *Ramulus mori*, an innovative Sangzhi alkaloids as an α -glucosidase inhibitor. *Yao Xue Xue Bao* 2019; (12): 1225-1233.
14. Ahn E, Lee J, Jeon YH, Choi SW, Kim E. Anti-diabetic effects of mulberry (*Morus alba* L.) branches and oxyresveratrol in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Sci Biotechnol* 2017; 26(6): 1693-1702.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Ebiche Co., Ltd. Mulberry Branch Liquor Extract Powder, Certified as an Individually Recognized Functional Ingredient That Can Help Control Blood Sugar. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety; 2021.
16. Seifter S, Dayton S, Novic B, Muntwyler E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem* 1950; 25(1): 191-200.
[PUBMED](#)
17. Dahlqvist A. Assay of intestinal disaccharidases. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44(2): 169-172.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Korean Diabetes Association. Diabetes Fact Sheet. Seoul: Korean Diabetes Association; 2020.
19. Forman LJ, Estilow S, Lewis M, Vasilenko P. Streptozocin diabetes alters immunoreactive beta-endorphin levels and pain perception after 8 wk in female rats. *Diabetes* 1986; 35(12): 1309-1313.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

20. Wu KK, Huan Y. Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 2007; 191(2): 241-249.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Kumar G, Sharmila Banu G, Murugesan AG. Attenuation of *Helicteres isora* L. bark extracts on streptozotocin-induced alterations in glycogen and carbohydrate metabolism in albino rats. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28(11): 689-696.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Marzouk M, Soliman AM, Omar TY. Hypoglycemic and antioxidative effects of fenugreek and termis seeds powder in streptozotocin-diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17(4): 559-565.
[PUBMED](#)
23. Gannon MC, Nuttall FQ. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein, and mRNA in rats. *Diabetologia* 1997; 40(7): 758-763.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Gold AH. The effect of diabetes and insulin on liver glycogen synthetase activation. *J Biol Chem* 1970; 245(4): 903-905.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
25. Bahnak BR, Gold AH. Effects of alloxan diabetes on the turnover of rat liver glycogen synthase. Comparison with liver phosphorylase. *J Biol Chem* 1982; 257(15): 8775-8780.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Akatsuka A, Singh TJ, Huang KP. Comparison of the liver glycogen synthase from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Biochem Biophys* 1983; 220(2): 426-434.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Liu L, Yu YL, Liu C, Wang XT, Liu XD, Xie L. Insulin deficiency induces abnormal increase in intestinal disaccharidase activities and expression under diabetic states, evidences from in vivo and in vitro study. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(12): 1963-1970.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
28. Ji T, Li J, Su SL, Zhu ZH, Guo S, Qian DW, et al. Identification and determination of the polyhydroxylated alkaloids compounds with alpha-glucosidase inhibitor activity in mulberry leaves of different origins. *Molecules* 2016; 21(2): 206.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Chen F, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*folium mori*) and cortex *mori radices* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 1995; 115(6): 476-482.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Hansawasdi C, Kawabata J. α -glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2. *Fitoterapia* 2006; 77(7-8): 568-573.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
31. Liu XM, Li L, Wang YJ, Fang M, Zhang YQ. Effects of mulberry branch bark extract on serum lipid levels of acute hyperlipidemic mice. *Sci Sericulture* 2011; 37(4): 771-774.
32. Ye F, Shen ZF, Qiao FX, Zhao DY, Xie MZ. Experimental treatment of complications in alloxan diabetic rats with α -glucosidase inhibitor from the Chinese medicinal herb *Ramulus mori*. *Yao Xue Xue Bao* 2002; 37(2): 108-112.
[PUBMED](#)
33. Ma YL, Zhang YQ, Zhou LX. The antioxidation and inhibitory effects of mulberry bark ethanol extract on α -glucosidase activity. *Sci Sericulture* 2010; 36(1): 143-147.