

db/db 마우스에서 상백피탕의 혈당강하 활성 및 기전연구

이성현* · 안세영* · 두호경* · 정성현*

*경희대학교 한의과대학, 약학대학

(Received September 3, 1999)

Blood Glucose Lowering Activity and Mechanism of Sangbackpitang (SBPT) in db/db Mouse

Sung Hyun Lee, Se Young An, Ho Kyung Du and Sung Hyun Chung*

College of Oriental Medicine and Pharmacy, Kyung Hee University Seoul 130-701, Korea

Abstract — Antidiabetic activity and mechanism of Sangbackpitang (SBPT) was examined in db/db mice, which is a spontaneously hyperglycemic, hyperinsulinemic and obese animal model. SBPT and acarbose were administered orally for 4 weeks. Fasting and non-fasting serum glucose, glycated hemoglobin and triglyceride were all reduced when compared between db/db control group and SBPT treated group. At 12th week after birth, SBPT increased an insulin secretion although statistic significance was not seen. Total activities of sucrase, maltase and lactase in SBPT treated group were all decreased when compared to db/db control. On the other hand, sucrase and maltase activities in acarbose treated groups were increased. Effect of SBPT on mRNA expression of glucose transporter(GLUT-4) was also examined. Quantitation of glucose transporter was performed by RT-PCR and *in vitro* transcription with co-amplification of rat β -actin gene as an internal standard. Muscular GLUT-4 mRNA expression in SBPT treated group was increased significantly. These results may suggest that SBPT lowered blood glucose ascribing to inhibition of glycosidase-catalyzed reaction and upregulation of muscular GLUT-4 mRNA expression.

Keywords □ Sangbackpitang (SBPT), db/db mouse, glycated hemoglobin, triglyceride, insulin, glycosidase, glucose transporter, RT-PCR.

당뇨병은 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애를 특징으로 하는 insulin의 절대적 또는 상대적 결핍 및 조직에서의 작용저하나 저항에 기인하는 疾患群이다.¹⁾

동양의학에서는 당뇨병의 병증을 消渴, 皮膚癢痒, 燥, 風痺, 痿, 二陽病, 癰疽, 眼昏, 痺痛 등의 범주에서 이해하고 있으며, 일반적으로 발현하는 증상의 유사함 때문에 消渴의 범주로 인식하고 있다.²⁾ 消渴은 飮食不節, 情志不調, 煩怒過度, 藥物中毒 등으로 발생한 진액부족과 燥熱이 주요 원인이며,³⁾ 병태에 따라 清熱補陰⁴⁾을 위주로 養肺降火生血⁵⁾ · 補腎水瀉心火⁶⁾ 등의 治法이 운용되고 있다.

인류 문명의 발달에 따른 식이형태와 생활양식의 변화로 인해 비만 인구나 함께 증가추세에 있는 인슐린 非依存型 당뇨병(non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM, type 2)은 인슐린의 분비가 절대적으로 부족한 인슐린 依存型 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM, type 1)과는 달리 인슐린 저항성이 주요한 병태생리학적 특징이다.⁷⁾ 인슐린 저항성은 유전적인 요인과 함께 말초조직에서 인슐린 감수성을 감소시키는 식이형태나 비만, 운동부족, 스트레스 등의 생활습관과도 밀접한 관련이 있는 병리 상태로 근육과 지방조직내 조직 특이적 단백질인 葡萄糖輸送體(glucose transporter, GLUT)의 결함도 주요한 원인으로 보고되고 있다.^{8,9)}

db/db mouse는 염색체 4번에 존재하는 diabetes

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0373 (팩스) 02-966-3885

gene(*db*, leptin receptor gene)의 돌연변이로 인해 多食, 점진적인 비만, 인슐린 저항성, 高렙틴血症, 고혈당 등 인슐린 非依存型 당뇨병과 유사한 임상적 특징을 가지므로 인슐린 저항성과 당뇨병에 대한 유전적 분석을 가능하게 하는 유용한 동물모델로서, 특징적으로 생후 3개월까지는 高인슐린血症과 체중증가를 보이다가 이후에는 혈액중 인슐린 농도가 점진적으로 감소하여 심한 인슐린 결핍증이 초래되는 것으로 보고되고 있다.^{10,11)}

당뇨병에 대한 東醫 方劑의 효능을 보고한 최근의 보고로 吳¹²⁾는 玉泉散을, 李¹³⁾는 黃湯加味方을, 金¹⁴⁾은 生津養血湯을, 金¹⁵⁾은 加味地黃湯을, 洪¹⁶⁾은 回春涼膈散을, 劉¹⁷⁾는 清心蓮子散과 玉女煎을, 張¹⁸⁾은 加味四物湯을, 李¹⁹⁾는 六味地黃湯을 검체로 하여 mouse의 혈당에 미치는 영향을 보았으나, 이들 연구가 대부분 제1형 당뇨병의 동물모델을 이용한 것으로 당뇨병 환자의 대부분을 차지하는 제2형 당뇨병에 대한 효능과 작용기전에 대해서는 연구가 미미하다. 이에 본 연구에서는 消渴의 通治方 中 桑白皮^{20,21)}를 君藥으로 立方된 桑白皮湯이 당대사에 미치는 영향 및 기전을 규명하고자 실험을 실시하였다.

실험방법

시료 - 실험에 사용한 약재는 시중에서 구입, 정선하여 사용하였으며, 方劑는 東醫寶鑑²²⁾ 消渴門에 기재된 桑白皮湯으로 方劑의 구성약물과 1帖 분량은 Table I 과 같다.

上記 方劑를 2帖 분량으로 조제하여 환류냉각기를 장치하여 수욕상에서 증류수(500 ml)로 3시간 동안 가열하여 3회 반복 추출한 후 온시 여과하여 얻은 여액을 모아 rotary evaporator를 사용하여 60 ml가 되게 감압 농축하였다.

시약 - Glucose, maltose, sucrose, PIPES, Trinder kit, GPO-Trinder kit, glycated hemoglobin HbA₁ kit, Tris, MgCl₂, CaCl₂, BSA, spermidine, DTT, DEPC, Triton X-100 등은 Sigma사, AMV reverse transcriptase, DNase, recombinant RNase inhibitor (rRNasin), random primers, dNTP, rNTP, T7 RNA polymerase 등은 Promega사, RNA extraction kit는 Ambion사, Taq DNA polymerase는 Beringer Mannheim사, 인슐린 radioimmunoassay kit는 EIKEN사, Bradford 시약(Coomassie-Brilliant Blue G-250 dye)은 Bio-Rad사, [α -³²P]CTP는 Amersham사에서 구입하였으며, 그의 시약은 시판 특급 혹은 일급시약을 사용하였다. PCR sense 및 antisense primer는 Bioneer사에 주문하여 사용하였다.

실험기기 - 본 실험에 사용한 기기 및 모델명은 다음과 같다. Centrifuge(CF-6000, Vision, Korea), Freeze dryer(FD-5N, EYELA, Japan), Gamma scintillation counter(Wallac 1409, Wallac, Filand), Homogenizer(Mazala A-1100, EYELA, Japan), Microcentrifuge(5417R, Eppendorf, Germany), Photographic system(SL-5, UVP, USA), Refrigerated bath circulator(RC-10V, JEIO TECH Co., Korea), Rotary evaporator(NE-1, EYELA, Japan), Shaking water bath(NTS-2000, EYELA, Japan), Thermal cycler(PTC-200, MJ Research, USA), UV spectrophotometer(U-3210, Hitachi, Japan)

실험동물 및 식이 - 7 주령의 옹성 C57BL/KsJ *db/db* 마우스(Jackson Laboratory, USA)를 3군으로 나누어 증류수 투여군을 *db/db* 대조군, 상백피탕 물추출물 투여군을 SBPT군, acarbose(5 mg/kg) 투여군을 acarbose군으로 설정하였고 한편 정상 대조군으로는 7 주령의 옹성 C57BL/KsJ +/- 마우스를 사용하였으며 이들을 lean군으로 명명하였다. 약물 투여기간은 8 주

Table I - Crude drugs and their amount constituted in Sangbackpitang

藥物名	生藥名	學名	重量(g)
桑白皮	Mori Cortex Radicis	<i>Morus bombycis Koidzumi</i>	7.500
白茯苓	Hoelen	<i>Poria cocos Wolff</i>	3.750
人參	Ginseng Radix	<i>Panax schinseng Nees</i>	3.750
麥門冬	Lirioepis Tuber	<i>Liriope muscari Bailey</i>	3.750
乾葛	Puerariae Radix	<i>Pueraria thunbergiana</i>	3.750
山藥	Dioscoreae Radix	<i>Dioscorea batatas Decaisne</i>	3.750
桂皮	Cassiae Cortex	<i>Cinnamomum cassia Blume</i>	3.750
甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer et. De Candolle</i>	1.875
Total Amount			31.875 g

령에서 12 주령까지 4 주간으로 상백피탕의 경우 증류수에 임상용량(60 ml 추출액을 60 kg 성인의 1-일 복용량으로 정하고, 이를 체중 25~30 g인 mouse에 대비하여 계산한 것) 10배의 시료를 용해시켜 음용수로 공급하였고 삼양사의 마우스 사료로 항온 항습 동물사육장에서 사육하였다.

매주 1 회 비공복시의 혈액중 포도당 농도와 체중을 측정하였고 투여 마지막날인 12주에는 공복시의 혈액을 채취하여 혈액중 포도당, 인슐린, 당화혈색소, 중성지방의 농도를 측정하였으며 척추 분리법으로 마우스를 희생시킨 후 소장과 근육조직을 절제하였다.

시료 채취 및 처리 방법 - 공복시의 체중 및 혈액 채취는 13 시간(PM 9:00~AM 10:00) 절식시킨 후 오전 10 시에 실시하였고, 비공복시의 체중 측정 및 혈액 채취는 오후 2 시에 실시하였다. 혈액중 포도당 농도 측정을 위한 혈액은 마취 없이 안외정맥을 통해 채취한 후 5000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장을 사용하였다. 척추 분리법으로 마우스를 희생시킨 후 소장을 분취하여 -70°C 냉동고에 보관한 후 glycosidase 활성 측정을 위해 사용하였으며, 포도당수송체 유전자발현을 측정하기 위해 절제한 근육조직은 -70°C 냉동고에 보관한 후 RNA 분리시 사용하였다.

생화학적 분석

혈액중 포도당 농도 측정 - 안외정맥에서 얻은 혈액을 5000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장내 포도당 농도를 glucose-oxidase 반응에 기초한 Trinder 법 (Sigma diagnostic glucose reagent)²³으로 측정하였다.

혈액중 인슐린 농도 측정 - 12주령 마우스의 안외정맥에서 얻은 혈액을 5000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장내 인슐린농도를 방사면역법(radioimmunoassay)²⁴으로 측정하였다.

혈액중 당화 혈색소 농도 측정 - 12주의 마우스로부터 공복시의 혈액을 채취한 후 cation-exchange chromatography법(Sigma glycosylated hemoglobin HbA₁ kit)²⁵으로 측정하였다.

혈액중 중성지방 농도 측정 - 12주의 마우스로부터 공복시의 혈액을 채취한 후 5000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장에서 중성지방을 McGowan 등의 방법²⁶이 변형된 변법(Sigma GPO-Trinder reagent)을 사용하여 측정하였다.

소장의 glycosidase 활성 검색 - 12주의 마우스에서 절취한 소장을 얼음 위에서 생리식염수로 세척하고 십이지장 부분을 같은 길이로 세 등분하여 각각을 proximal, middle, distal로 구분하여 각 부분별로 glycosidase 효소액을 제조하였다. 각 군별, 각 부분별 효소액을 기질과 반응시켜 glycosidase의 효소 활성을 측정하였고 이때 단백질량은 Bradford법²⁷으로 측정하여 단위 단백질당 glycosidase의 specific activity를 계산하였다. 소장의 glycosidase 효소액 제조와 활성 측정²⁸은 아래의 방법으로 실시하였다.

등분한 소장을 생리식염수로 세척한 후 균질화 완충액(0.5 M NaCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA, pH 7.0)을 가하여 polytron homogenizer를 이용하여 균질화한 후 20,000 g에서 30 분간 원심분리하여 얻은 침전물에 다시 균질화 완충액을 가하여 원심분리하였다. 마지막에 얻은 침전물에 생리식염수를 가한 후 3,000 rpm에서 40 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다.

50 mM PIPES buffer(pH 6.8)에서 각 효소에 해당되는 이당류(maltose, sucrose, lactose)를 기질로 하여 효소액과 함께 37°C에서 30 분간 반응시켰다(반응액중 최종 기질 농도 30 mM, 총 부피 200 µl). 효소 반응 결과 유리된 D-glucose는 Trinder법으로 측정하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)과 *in vitro* transcription - Glucose transporter mRNA의 정량은 internal standard와 함께 RT-PCR과 *in vitro* transcription 방법에 의해 실시하였다.²⁹ 각 조직으로부터 guanidine thiocyanate와 acid phenol extraction을 이용한 Chomczynski 등의 방법³⁰으로 RNA를 분리하였다.

분리한 RNA를 DNase(DNase 50 unit, rRNasin 20 unit, 50 mM Tris(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 2.5 µg BSA, 총 부피 50 µl)로 37°C에서 60 분간 처리하여 genomic DNA를 제거한 후, reverse transcription 반응(AMV reverse transcriptase 10 unit, 1×buffer(50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM KCl, 0.5 mM spermidine, 10 mM DTT), random primers 0.5 µg, 2.5 mM dNTPs, rRNasin 20 unit, 총 부피 50 µl)을 37°C에서 60 분간 실시하여 cDNA를 합성하였다.

생성된 cDNA를 주형으로 하여 Taq DNA poly-

merase 2 unit, 1×buffer(10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100), 200 μM dNTPs, 12 pmole의 sense와 antisense primer(총 부피 50 μl)를 사용하여 GLUT-4 cDNA 일부분을 증폭하였다. 이때 PCR 조작 조건은 94°C에서 30 초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30 초간 extension을 30회 반복하고 72°C에서 5 분간 post-incubation한 후 1% 한천 겔 전기영동을 통해 확인하였다.

GLUT-4 upstream primer로 5'-ACA GAA GGT GAT TGA ACA GAC-3'와 downstream primer 5'-AAC CGT CCA AGA ATG AGT ATC-3'는 muscle/adipose tissue-type transporter cDNA sequence³¹⁾를 기초로 디자인하였으며 이때 생성되는 PCR product의 크기는 각각 561, 285 bp이었다. Sense primer의 5' 말단에는 T7 RNA polymerase promoter(5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3')와 GG-GAGA 전사시작 서열을 붙여서 증폭된 cDNA로부터 RNA가 전사될 수 있도록 하였다.

증폭된 cDNA로부터 *in vitro* transcription 반응(T7 RNA polymerase 10 unit, 1×buffer(40 mM Tris(pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 2 mM spermidine, 10 mM DTT), 0.5 mM rATP, rGTP, rUTP, 12 μM rCTP, rRNasin 10 unit, [α -³²P]CTP, PCR product 3 μl, 총 부피 25 μl)을 37°C에서 60 분간 실시하여 *in vitro* transcript를 합성하였다. 이를 4.5% denaturated polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 겔을 건조한 후 자가 방사 기록하고 겔 상의 띠를 잘라 방사 측정하였다.

통계처리 - 모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하였으며, 결과는 평균과 표준편차로 표시하였다. 桑白皮湯의 투여에 따른 영향 검증하기 위해 two way-ANOVA로 분석하였다. 각 군간의 유의

성은 general linear model(GLM)의 Duncan's multiple test에 의해 비교하였으며, p<0.05에서 유의성을 검증하였다.

실험결과 및 고찰

포도당 농도

소장내 glycosidase 저해활성이 탁월한 상백피를 주약으로 구성된 상백피당의 혈당강하 활성을 살펴보기 위해 본 실험에서는 비공복시 혈당(glycosidase 저해제는 비공복시 혈당을 낮추어주는 활성이 탁월함)과 공복시 혈당을 측정하였다.

비공복시 혈당은 db 대조군의 경우 8주에서 9주 사이에 급격한 증가 현상을 보였으며 9주에서 12주까지는 혈당이 581~611 mg/dl 수준으로 유지되는 경향을 나타내었다. 상백피탕 투여군에서는 투여 2주째부터 혈당강하 효과가 나타나기 시작하여 지속적으로 혈당강하 활성을 나타냈고 마지막 주인 12주째 비공복시 혈당은 lean군, db 대조군, SBPT군, acarbose군의 순으로 132, 611, 555, 590 mg/dl이었다. Acarbose군의 경우 10주부터 혈당강하 효과가 나타나기 시작하였으나 그 이후에는 대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table II).

한편 투여 마지막주(12주째)에 각 군간에 공복시 혈당을 측정해 본 결과 lean군, db 대조군, SBPT군, acarbose군의 순으로 107, 464, 315, 346 mg/dl 이었다. 상백피탕을 4주간 투여한 군은 대조군에 비해 공복시 혈당이 150 mg/dl 가량 떨어져 acarbose보다 나은 혈당강하 활성을 나타내었다.

인슐린 분비

본 실험에서 시료투여후 4주(생후 12주)의 공복시 혈액중의 인슐린 농도를 측정한 결과, db 대조군은

Table II - Effects of SBPT and acarbose on nonfasting blood glucose level

Group	Blood glucose (mg/dl)				
	8th	9th	10th	11th	12th
Lean	140 ± 8 ^c	145 ± 5 ^c	135 ± 11 ^c	126 ± 6 ^c	132 ± 3 ^c
db/db	512 ± 22 ^a	581 ± 44 ^a	581 ± 12 ^a	640 ± 32 ^a	611 ± 43 ^a
SBPT	517 ± 46 ^a	517 ± 22 ^b	497 ± 14 ^b	588 ± 24 ^b	555 ± 38 ^b
Acarbose	477 ± 12 ^a	562 ± 18 ^a	492 ± 20 ^b	611 ± 16 ^a	590 ± 16 ^a

Nonfasting body weight was measured by weekly. All data are mean ± SE.

Different alphabet means significantly difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; acarbose, Acarbose-administered group

Table III – Effects of SBPT and acarbose on serum insulin level

Group	Serum insulin ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	
	12th	
Lean	26.411.1	
db/db	125.235.1	
SBPT	165.425.7	
Acarbose	132.735.6	

Fasting serum insulin level was measured on the 12th week after birth.

All data are mean \pm SE. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group

lean군에 비해 6배 정도 높은 인슐린 농도를 나타내었고 SBPT군은 db 대조군에 비하여 1.3배, acarbose군은 1.1배 증가된 인슐린치를 나타내었으나 유의성있는 차이를 나타내지는 못하였다(Table III). 이 결과 상백피당은 당뇨쥐에서 약간의 인슐린분비 촉진 작용을 나타낸 것으로 사료되며 이는 상백피당의 인슐린분비 촉진 작용이 있다고 알려진³²⁾ Moran A라는 glycoprotein 성분에 의해 일어난 현상이 아닌가 추측되나 상백피당의 다른 성분에 의해서도 인슐린분비가 자극될 수 있음을 부인할 수 없다.

당화혈색소 농도

당뇨병 환자의 경우 고혈당이 상당기간 지속됨으로써 효소에 의해 매개되지 않는 단백질의 비특이적 당화반응이 촉진되며 당뇨병성 미세혈관 합병증이 발병하게 된다. 헤모글로빈 또한 비특이적으로 당화반응을 받게 되므로 당화혈색소 수치는 당뇨병 환자에 있어서 장기간 혈당 조절의 지표로 사용된다. 당뇨병성 망막증의 경우 당화혈색소의 농도가 혈액중 포도당 농도보다 성인성 당뇨환자의 망막병증 발병과 진행에 더 의미있는 지표로서 9%에서 11%로 2% 증가하면 망막병증의 위험이 2 배 증가함이 보고된 바 있다.³³⁾ 따라서 당화혈색소의 수치는 약물치료 효과를 판정하는데 매우 중요한 자료가 된다.

본 연구에서 시료 투여 마지막주에 당화혈색소 농도를 측정해본 결과 lean군, db 대조군, SBPT군, acarbose군의 순으로 각각 7.0 ± 0.2 , 11.4 ± 2.0 , 6.0 ± 0.2 , 10.8 ± 0.9 %로 상백피탕 투여군은 정상 대조군보다도 낮은 당화혈색소치를 나타낸 반면 acarbose군은 당뇨대조군보다 약간 낮은 수준을 보였다(Fig. 1). 이는 SBPT 투여군에서 혈당이 감소한 결과와도

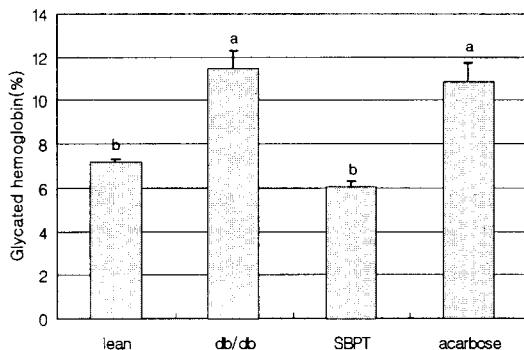


Fig. 1 – Effects of SBPT and acarbose on blood glycated hemoglobin level in db/db mice. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group. All data are mean \pm SE. Different alphabet means significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

일치하는 것으로 지속적으로 혈당이 조절되었음을 시사한다.

중성지방 농도

제2형 당뇨환자에서 볼 수 있는 지질대사 이상으로 고지혈증, 특히 고중성지방혈증이 가장 높은 빈도로 나타나며³⁴⁾ 이러한 고지혈증은 그 자체가 죽상 동맥경화를 유발하거나 진행을 가속화시킨다. 고중성지방혈증은 간에서 초저밀도지질단백(very low density lipoprotein, VLDL)의 합성이 증가되거나 lipoprotein

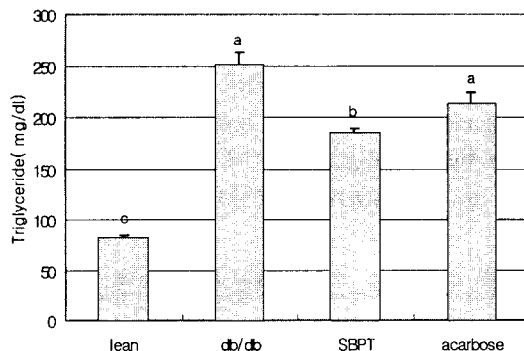


Fig. 2 – Effects of SBPT and acarbose on fasting serum triglyceride level in db/db mice. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group. All data are mean \pm SE. Different alphabet means significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table IV – Effects of SBPT and acarbose on intestinal sucrase activity

Group	Sucrase activity		
	Proximal	Middle	Distal
Lean	13.4	7.5	5.4
db/db	25.4	22.0	13.6
SBPT	18.6	16.1	12.2
Acarbose	28.5	25.4	10.2

At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the entire jejunioleum was removed and divided into three segments of equal length. Intestinal segment of individual mouse in each group was pooled, homogenated and its sucrase activity was determined by nmoles of released glucose per mg protein in one minute. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group.

lipase의 활성감소로 인해 발병한다. 제2형 당뇨병에서 저밀도지질단백(low density lipoprotein, LDL)은 정상농도를 유지하나 VLDL의 합성이 증가하는 IIb형 고지혈증이 일반적이며 이들 환자에서 혈중 유리 지방산의 증가는 인슐린 저항성을 조장하여 혈당의 조절을 악화시킬 수 있다.³⁵⁾

본 실험에서 시료 투여 마지막주에 혈액 중 중성지방 농도를 측정해본 결과 lean, db/db 대조군, SBPT, acarbose군의 순으로 각각 81 ± 4 , 249 ± 13 , 187 ± 6 , 212 ± 12 mg/dl로서 lean 대조군에 비해 db/db 대조군은 3배 이상 증가되었고, SBPT 투여군은 db 대조군에 비해 24.9% 유의적으로 감소하였다(Fig. 2).

소장 glycosidase 활성

본 실험에서는 상백피당을 4주간 장기투여후 소장내 α -glycosidase 효소활성의 변화 양상을 소장 부위별로 살펴보았다.

Table IV는 그룹간 sucrase 활성을 비교한 결과이다. db 대조군에서 lean군보다 세 부분 모두 sucrase 효소 활성이 유도되었고(proximal 2배, middle 3배, distal 2.5배), 각 부분간 효소 활성의 크기는 proximal>middle>distal의 순이었다. 이러한 결과는 db 대조군의 경우 lean에 비해 소장을 통해 흡수되는 포도당의 총량이 2배 이상임을 의미하며 그 결과 혈중 포도당치가 증가하고 과잉의 포도당으로 인해 db 대조군에서 과도한 지방축적이 이루어짐을 시사한다. SBPT군의 경우 proximal, middle, distal 부분에서 db 대조군보다 감소하였고, acarbose군의 경우는 distal 부위를 제외하고 오히려 약간씩 증가하는 경향이 관찰

Table V – Effects of SBPT and acarbose on intestinal maltase activity

Group	Maltase activity		
	Proximal	Middle	Distal
Lean	227.7	239.2	238.3
db/db	373.7	396.1	477.7
SBPT	183.0	170.5	158.5
Acarbose	423.9	407.6	762.6

At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the entire jejunioleum was removed and divided into three segments of equal length. Intestinal segment of individual mouse in each group was pooled, homogenated and its maltase activity was determined by nmoles of released glucose per mg protein in one minute. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group.

Table VI – Effects of SBPT and acarbose on intestinal lactase activity

Group	Lactase activity		
	Proximal	Middle	Distal
Lean	2.93	2.49	1.36
db/db	3.57	3.41	7.96
SBPT	3.26	3.61	1.55
Acarbose	3.81	3.91	1.85

At the completion of the experiment, animals were sacrificed. Immediately the entire jejunioleum was removed and divided into three segments of equal length. Intestinal segment of individual mouse in each group was pooled, homogenated and its lactase activity was determined by nmoles of released glucose per mg protein in one minute. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group.

되었다. SBPT 투여군의 경우 상대적으로 sucrase의 활성이 큰 proximal, middle 부분에서는 감소의 폭이 큰 반면(27%) 활성이 작은 distal 부분에서는 효소역제 작용이 작았다(10%). 반면, acarbose군은 proximal, middle 부분에서는 증가하고 활성이 작은 distal 부분에서는 감소하였다.

Table V는 그룹간 maltase 활성을 비교한 결과이다. db 대조군이 lean군보다 proximal, middle, distal 전 부분에서 2배 정도 maltase 활성이 증가되었고 sucrase와는 반대로 각 부분의 활성의 크기는 proximal<middle<distal의 순이었다. SBPT군은 db 대조군과 비교시 전 부분에서 maltase 활성이 감소된 반면 acarbose군의 경우는 세 부분에서 전반적으로 maltase 활성이 증가되었는데, 특히 distal 부분에서는 db 대조군보다 1.6배 증가하였다.

Table VI는 그룹간 lactase 활성을 비교한 결과이다.

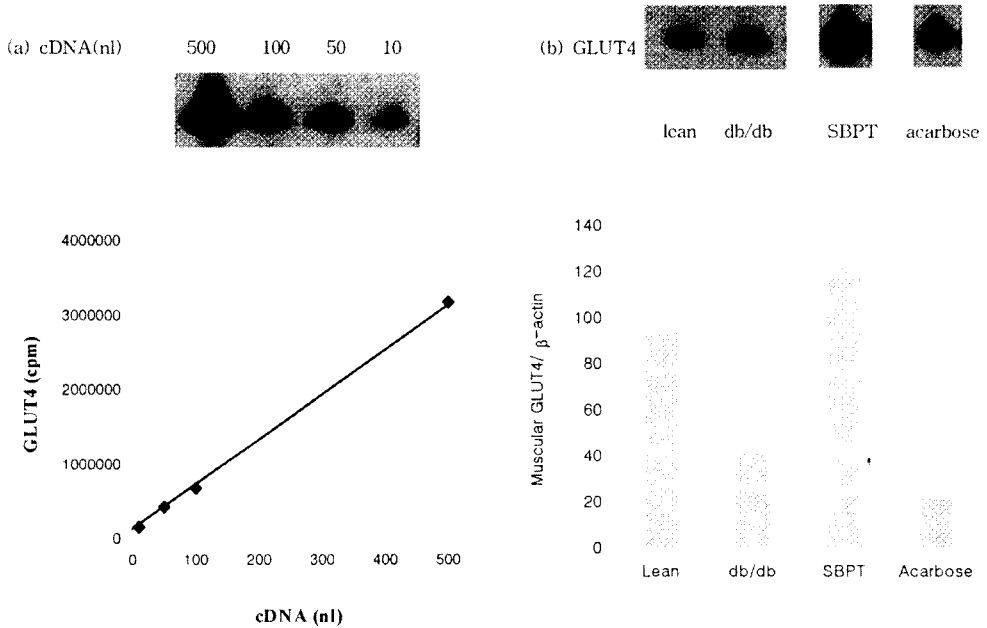


Fig. 3 – Effects of SBPT and acarbose on GLUT-4 mRNA expression in quadriceps muscle. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SBPT, Sangbackpitang-administered group; Acarbose, acarbose-administered group. (a) Calibration curve of GLUT-4 cDNA PCR products; (b) Effects of SBPT and acarbose on GLUT-4 and β -actin mRNA expressions.

db 대조군이 lean군보다 proximal, middle, distal 전 부분에서 약간씩 lactase 활성이 증가되었고 각 부분 간 효소 활성의 크기는 sucrase와 마찬가지로 proximal>middle>distal의 순이었다. db대조군과 시료투여 군간의 lactase 활성은 앞의 두 효소와는 달리 커다란 차이를 볼 수 없었다. 아카보즈나 상백피탕은 β -glycosidic linkage의 가수분해반응에는 저해작용이 크지 않음을 보여주고 있다.

그룹간 glycosidase 활성을 비교한 결과들을 종합해 보면, db 대조군은 lean 군에 비해 소장 전부분에 걸쳐 효소활성이 유도되었다. 시료투여군의 경우 SBPT 군에서는 총 효소활성(proximal에서 distal까지 합친)이 db 대조군에 비해 감소하였다. Sucrase의 경우 db 대조군과 SBPT군의 총 효소활성은 61.0(단위는 nmoles of glucose produced/mg protein/min)에서 46.9로, maltase의 경우 1,248에서 512로, lactase의 경우 9.94에서 8.42로 뚜렷한 효소억제 활성을 나타내었다. 이 결과는 상백피탕이 소장내 glycosidase 효소활성을 지속적으로 억제하였음을 의미한다. 한편 acarbose군에서는 각 효소의 총 활성이 오히려 db 대조군에 비

해 증가되는 경향을 보여주었다. 투여용량에서 glycosidase에 대한 강한 저해작용의 결과 보상으로 효소 단백질의 발현이 증가된 것이 아닌가 추측된다.

근육조직에서 GLUT-4 mRNA 발현

제2형 당뇨 환자의 주요 병태생리학적 특징은 말초 조직에서 인슐린 저항성으로 주로 근육조직에서 인슐린 반응의 결함으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 근육에서 이러한 인슐린 저항성을 일으키는 요인으로 포도당수송체에 의한 포도당 수송의 결함을 들 수 있는데, 이는 인슐린 의존성 조직인 근육조직에서 인슐린 자극에 의한 조직내로의 포도당 수송이 포도당 이용 속도를 결정짓는 율속단계로 생각되기 때문이다.⁹⁾

근육이나 지방조직에서 인슐린 의존성 포도당 수송을 담당하는 것은 hexose carrier중 GLUT-4 형으로, db/db 마우스나 스트렙토토신 유도 고혈당 흰쥐의 근육조직에서 GLUT-4의 mRNA 및 단백질 함량이 감소함이 보고되었다.³⁶⁾ 또한 Gibbs 등은 db/db 마우스에 human GLUT-4를 overexpression시킨 마우스에서 혈당이 감소함을 보고하여 GLUT-4의 증가가 인

슐린 저항성을 개선시킬 수 있음을 시사하였다.³⁷⁾

본 실험에서는 SBPT 추출물의 투여로 인한 근육조직의 GLUT4 mRNA 발현의 변화를 살펴봄으로서 말초 인슐린 저항성이 개선 혹은 악화되는지를 살펴보았다. Fig. 3에서 보는바와 같이 db 대조군은 lean군에 비해 GLUT4 mRNA양이 55.9% 감소하였으나 (muscular GLUT4 mRNA/ β -actin mRNA, db/db 대조군: 41.5, lean군: 94.1), SBPT 추출물의 투여로 인해 GLUT4 mRNA양이 3배가량 증가하였다(muscular GLUT4 mRNA/ β -actin mRNA, db/db 대조군: 41.5, SBPT: 122.4). 이러한 결과로부터 SBPT 추출물의 투여는 GLUT4의 감소로 인해 인슐린 저항성이 발생 혹은 악화된 경우 GLUT4의 발현을 회복시킴으로서 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 SBPT 추출물이 GLUT4 mRNA 발현에 직접적으로 영향을 미치는지 아니면 다른 기전에 의해 고혈당을 조절한 결과로 인한 간접적인 결과인지에 대한 연구를 진행할 계획이다.

결 론

동의 방제중 상백피당을 db/db mouse에 4주간 투여한 후 얻은 결론은 다음과 같다.

첫째, 공복 및 비공복시 혈당, 당화혈색소, 중성지방의 농도가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

둘째, 상백피당 투여군에서 소장내 glycosidase 활성의 감소와 근육조직내 포도당수송체인 GLUT-4의 발현이 증가한 것으로 보아 상백피당의 혈당강하기전은 glycosidase 저해와 포도당수송체의 증가에 기인한 것으로 여겨진다.

감사의 말씀

본 연구는 '97 한의학발전연구지원사업에 의해 "소갈처방의 효능검색" 연구과제 지원연구비에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) 大韓醫學協會 分科學會 協議會 : 糖尿病의 治療, 서울, 麗文閣, p. 1 (1992).
- 2) 上海中醫學院 : 中醫內科學, 上海, 商務印書館, p. 503 (1975).
- 3) 葉天士 : 臨證指南醫案, 北京, 和夏出版社, p. 313 (1995).
- 4) 張介賓 : 景岳全書, 北京, 人民衛生出版社, p. 406 (1995).
- 5) 朱震亨 著, 方廣 註 : 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社, 下卷, p. 503 (1984).
- 6) 方賢 : 奇效良方(二), 香港, 商務印書館, p. 642 (1977).
- 7) 杜錦京 : 臨牀腎系學研究, 서울, 成輔社, p. 526 (1995).
- 8) Hanjoong Jo, Robert W. Hardy and Jay M. McDonald : Regulation of Glucose Transport, *Diabetes* 15, 1 (1991).
- 9) Zeil, F. H. and Venkatesa, M. B. : Davidson. Glucose transport is rate-limiting for skeletal muscle glucose metabolism in normal and STZ-induced diabetes rats. *Diabetes* 37, 885 (1988).
- 10) Yun-Ping Zhou, Per-Olof Berggren, and Valdemar Grill : A Fatty Acid-Induced Decrease in Pyruvate Dehydrogenase Activity Is an Important Determinant of β -Cell Dysfunction in the obese Diabetic db/db Mouse, *Diabetes* 45 (1996).
- 11) Weigle, D. S. and Kuijper, J. L. : Mouse models of human obesity. *Science & Medicine*, May/June, 38 (1997).
- 12) 吳政錫 外 : 玉泉散이 Alloxan 投與 白鼠 血清의 代謝基質에 미치는 影響, 서울, 東醫病理學會誌 5, 77 (1990).
- 13) 李雄植 : 消渴에 應用되는 黃耆湯加味方이 KK mouse의 代謝機能에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院 (1985).
- 14) 金信錫 : 高血糖 쥐의 腎臟 酵素活性에 미치는 生津養血湯의 影響, 서울, 大韓東洋醫學雜誌 15, 429 (1994).
- 15) 金聖泰, 曹東鉉, 杜錦京 : 加味地黃湯이 Streptozotocin 投與 白鼠 血糖量에 미치는 影響, 경희한의대 논문집 15, 397 (1992).
- 16) 洪鍾秀 外 : 回春煎湯散이 Streptozotocin 投與 白鼠의 血糖量에 미치는 影響, 서울, 慶熙韓醫大論文集 14, 397 (1991).
- 17) 劉東吳 外 : 清心蓮子飲과 玉女煎이 Streptozotocin 投與로 誘發된 白鼠의 高血糖에 미치는 影響, 서울, 慶熙醫學 6, 500 (1990).
- 18) 張世煥 : 加味四物湯이 糖尿에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 박사학위논문, 人邱, 大邱韓醫科大學 大學院 (1990).

- 19) 이철완 : 熟地黄의 修治差異에 따른 六味地黄湯煎液의 糖尿性 고지혈증에 미치는 影響, 대전, 대전대학교 대학원 (1997).
- 20) 柳志允 : 桑白皮(Mori Cortex Radicis)가 高血糖 家兎의 血糖量變化에 미치는 影響, 석사학위논문, 경희대학교 대학원, 서울 (1973).
- 21) Fujun Chen, Noboru Nakashima et al: Hypoglycemic Activity and Mechanism of Extracts from Mulberry Leaves(Folium Mori) and Cortex Mori Radicis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice, Japan, 藥學雜誌 **115**(6), 476 (1995).
- 22) 許凌 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p. 508 (1994).
- 23) Trinder, P.: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**, 24 (1969).
- 24) Johnstone, A. and Thorpe, R.: Immunoassays in Immunochemistry in Practice 2nd., Blackwell Scientific Publications. London, pp. 246-254 (1987).
- 25) Schifreen, R. S., Hickingbotham, M. J., Bowers, G. N.: Accuracy, precision, and stability in measurement of hemoglobin A_{1c} by "high performance" cationexchange chromatography. *Clin. Chem.* **26**, 466 (1980).
- 26) McGowan, M. W., Artiss, J. D., Strandbergh, D. R. and Zak, B.: A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* **29**, 538 (1983).
- 27) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 28) Rhinehart, B. L., Robinson, K M., LiU, P. S., Payne, A. J., Whetley, M. E. and Wagner, S. R.: Inhibition of intestinal disaccharidase and supression of blood glucose by a new -glycosidase inhibitor-MDL25,637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**(3), 915 (1987).
- 29) Horikoshi, T., Daneberg, K. D., Stadlbauer, T. H. W., Volkenandt, M., Shea, L. C. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P. and Daneberg, P. V.: Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* **52**, 108 (1992).
- 30) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156 (1987).
- 31) Hikino, H. and Oshima, Y.: Isolation and hypoglycemic activity of Moran A, a glycoprotein of Morus Alba root bark. *Planta Medica* **159** (1985).
- 32) Nathan, D. M., Singer, D. E., Godine, J. E., Harrington, C. H. and Perlmutter, L. C.: Retinopathy in older type II diabetes. *Diabetes* **35**, 797 (1986).
- 33) Muekler, M., Caruso, C., Baldwin, S., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W., Lienhard, G. E., Lodish, H. F.: Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter. *Science* **229**, 941 (1985).
- 34) Fredrick, L. D.: Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diab. Metab. Rev.* **6**, 41 (1990).
- 35) Kissebah, A. H., Alfrasis, S., Evans, D. J. and Adams, P. W.: Integrated regulation of very-low-density lipoprotein triglycerides and apolipoprotein B kinetic in NIDDM. *Diabetes* **31**, 217 (1992).
- 36) Garvey, W. T., Huecksteadt, T. P. and Birnbaum, M. J.: Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science* **245**, 60 (1989).
- 37) Gibbs, E. M., Stock, J. L. and McCold, S. C.: Glycemic Improvement in Diabetic db/db Mice by Overexpression of the Human Insulin-regulatable Glucose Transporter(GLUT-4). *J Clin Invest* **95**, 1512 (1995).