

桑椹子추출물이 ob/ob mouse의 혈당, 혈청 지질, Polyol Pathway, AGE 및 RAGE에 미치는 영향

이민동 · 정지천*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Mori Fructus Extract on Hyperglycemia, Hyperlipidemia, Polyol Pathway, AGE and RAGE in ob/ob Mice

Min Dong Lee, Ji Cheon Jeong*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Etiological studies of diabetes and its complications showed that oxidative stress might play a major role. Therefore, many efforts have been tried to regulate free oxygen radicals for treating diabetes and its complications. Mori Fructus extract has been known to be effective for the antidiabetic, antihyperlipidemic and antiobesitic prescription, and composed of four crude herbs. The aim of this study was to investigate the effect of Mori Fructus extract in male ob/ob mouse with severe obesity, hyperinsulinemia, hyperglycemia, hyperlipidemia. Mice were grouped and treated for 5 weeks as follows. Both the lean (C57BL/6J black mice) and diabetic (ob/ob mice) control groups received standard chow. The experimental groups were fed with a diet of chow supplemented with 7.5, 15 and 30 mg Mori Fructus extract per 1 kg of body weight for 14 days. The effects of Mori Fructus extract on the ob/ob mice were observed by measuring the serum levels of glucose, insulin, lipid components, and the kidney levels of reactive oxygen species (ROS), MDA+HAE, GSH and also the enzyme activities involved in polyol pathway. Western blotting was performed using anti-AGE, anti-RAGE respectively. Mori Fructus extract lowered the levels of serum glucose and insulin in a dose dependent manner. Total cholesterol, triglyceride and free fatty acid levels were decreased, while the HDL-cholesterol level was increased, in Mori Fructus extract treated groups. Renal aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activities were increased in the ob/ob mice, whereas those were inhibited in the Mori Fructus extract-administered groups. Mori Fructus extract inhibited the generation of ROS in the kidney. MDA+HAE level was increased and the GSH level was decreased in the ob/ob mice, whereas those were improved in the Mori Fructus extract-administered groups. Mori Fructus extract inhibited the expression of AGE, RAGE in the ob/ob mice. The results suggested that Mori Fructus exerted the antidiabetic and antihyperlipidemic activities by regulating the activities of polyol pathway enzymes, scavenging the ROS, decreasing the MDA+HAE level, increasing the GSH level and inhibiting the expression of AGE, RAGE in the ob/ob mice.

Key words : Mori Fructus, ob/ob mouse, antidiabetic activities, polyol pathway, oxidative stress, AGE, RAGE

서 론

제2형 당뇨병 (Type 2 : non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)은 인슐린 저항성과 이에 따른 인슐린의 상대적 결핍을 나타낸다^{1,2)}. 인슐린은 여러 신호 전달체계를 통해 포도당

* 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1, 동국대 경주한방병원 2내과

· E-mail : jjqh@paran.com, · Tel : 054-770-1265

· 접수 : 2009/01/23 · 수정 : 2009/02/19 · 채택 : 2009/03/02

의 대사, 지방과 단백질의 대사, 세포의 분화 및 성장 등에 관여하므로 인슐린 저항성이 발생하면 단순히 당대사의 이상만을 초래하는 것이 아니라 여러 조직에 다양한 영향을 미치게 된다³⁾. 특히 고혈당, 고인슐린혈증, 지질 대사 이상 등과 함께 혈관 평활근세포의 과도한 이동과 증식을 일으켜 동맥경화를 촉진한다^{3,4)}.

당뇨병 환자와 당뇨병 실험동물에서 반응성 산소유리기 (reactive oxygen species, ROS)의 생성이 증가되어 있고, 증가된 ROS가 혈관의 인슐린 저항성을 유발하는 과정에서 혈관세포의

증식 이상과 관련된 세포내 신호전달 체계가 활성화되어 당뇨병성 혈관합병증이 발생하는 것으로 추측되고 있다^{5,6)}. ROS는 반응성이 강하고 친핵성의 경향이 뛰어나 oxidative stress를 야기하여 조직이나 세포에 치명적인 영향을 준다⁷⁾.

Oxidative stress를 한층 가속화시키는 비정상적인 당 대사 과정으로 polyol pathway가 있는데, 인산화 과정 없이 포도당을 이용하는 경로로서 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase에 의해 반응이 이루어진다. 이 과정에 의해 세포 내에 과당(fructose)이 축적되어 각종 합병증이 진행된다^{2,8,9)}.

한편, 당뇨병과 그 합병증을 비롯하여 동맥경화증, 고혈압, 만성신부전, alzheimer's disease 등의 질환에서 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)의 농도가 증가된 것이 발견되었다^{10,11)}. AGE는 세포 표면에 존재하는 AGE 수용체인 최종당화산물 수용체 (receptor for AGE : RAGE)를 통해서 세포 손상을 유발한다^{10,12)}. RAGE는 immunoglobulin superfamily에 속하는 단백질로서 포유동물의 여러 조직과 세포에서 발현하면서 AGE에 의한 세포 손상을 매개하는 중요한 세포병리학적 기능을 가지는데^{10,12)}, 당뇨병과 같은 병적인 상태에서 발현이 증가된다¹³⁾.

당뇨병은 東洋醫學에서 消渴의 범주에 속하며, 주된 病機가 陰津虧損 燥熱内生으로서 清熱生津 止渴 滋陰 등의 治法이 활용되고 있다^{14,15)}. 消渴이 오래되거나 誤治할 경우에 癰疽, 腦疽, 背癩, 中滿, 鼓脹, 水病 및 失明 등의 消渴傳變證이 발생하는데 당뇨병의 만성 합병증과 유사하다¹⁶⁾. 실험연구에 의하면 順氣散¹⁷⁾이 ob/ob mouse의 혈당을 저하시키고, 清血散¹⁸⁾이 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 억제하고 활성산소를 소거시키며 AGE와 RAGE 함량을 감소시키는 것으로 보고되었다.

桑椹子 (Mori Fructus)는 뽕나무의 열매 (오디)를 건조한 것으로 益腎 固精 滋陰 養血 生津止渴 潤腸 安魂鎮神 聰耳明目 利水消腫 解酒烏髮 등의 효능을 가지고 있으며 肝腎陰虛 消渴 耳鳴 目暗 등의 치료에 활용되어 왔다^{19,20)}. 실험 연구에 의하면 α-glucosidase 활성을 저해하여 혈당 감하 작용을 나타내고²¹⁾ 항산화 작용이 있으며²²⁾ 운동능력을 향상시키며 피로를 회복시키는 것으로²³⁾ 보고되었다.

이에 저자는 桑椹子가 2형 당뇨병 동물 모델인 ob/ob 마우스에서 혈당 및 혈청지질, polyol pathway에 관여하는 효소의 활성, ROS 생성, 과산화지질 및 glutathione 함량 등에 미치는 영향을 검토하고 AGE, RAGE 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

桑椹子 (Mori Fructus)는 산지 (무주, 전북, 대한민국)에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

시약은 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA), NP-40, CAPS, protease inhibitors,

DL-penicillamine, bovine serum albumine, potassium phosphate는 Sigma-Aldrich chemical Co. (ST. Louis, MO, USA), 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), 1차 항체인 RAGE, histone H1과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), AGE는 Cosmo Bio (Cosmo Bio, Japan)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다. 기기는 GENios (GENios-basic, TECAN, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였다.

3) 동물

생후 5주령된 체중 30 g 내외의 외관상 건강한 수컷 ob/ob 마우스와 C57BL/6J 마우스 (중앙실험동물, 서울, 한국)를 7일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 22℃ 내외, 습도는 50%로 유지하고 light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, 마우스용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

桑椹子 300 g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 85.20 g (수율 28.4%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 실험군 및 검액 투여

실험 동물은 C57BL/6J 마우스로 정상군, ob/ob 마우스로 대조군, ob/ob 마우스에 桑椹子추출물을 각각 7.5, 15, 30 mg/kg 투여한 실험군 등 5군으로 나누었으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 검액은 사료에 섞어 14일간 투여하였다.

3) 생체 시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 심장에서 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 glucose, insulin 등의 측정원으로 사용하였고, 신장을 채취하여 생리 식염수로 잘 씻어내고 Whatman 여과지로 식염수를 제거한 후 -70℃에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 신장 조직의 일부에 4배 용량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉 하에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 600 × g에서 10분간 원심분리하고, 상층액은 8,000 × g에서 다시 20분간 원심분리하여 침전물인 mitochondria층을 분리하였으며 이를 제거한 상층액을 취하여 ROS 및 GSH 등의 측정을 위한 시료로 사용하였다. 또한 western blot 수행을 위해 신장 조직에 0.1 M HEPES, 1 M KCl, 30 mM MgCl₂, 0.1 M PMSF 등이 포함된 buffer를 가하여 균질화 하고 ice에 20분간 방치한 후 10% NP-40을 넣고 12,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리한 상층액을 cytosol 분획으로 하였고 pellet에 0.1 M HEPES, 1 M KCl, 1 M NaCl, 0.1 M PMSF, 10% glycerol 등이 포함된 buffer를 가하여

resuspension하고 튜브를 vortexing해 주면서 ice에 20분간 방치한 뒤 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 상층액을 nuclear fraction으로 하여 실험에 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 0~4°C에서 실시하였다.

4) Glucose 함량 측정

혈청중 glucose 함량은 Thomason 등의 방법²⁴⁾에 따라 조제된 시약 kit (아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. glucose 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

5) Insulin 함량 측정

혈청중 insulin 함량은 anti-insulin이 coated된 96 well plate가 포함되어 있는 시약 kit (Shibayagi Co., Ltd.)를 사용하여 정량하였다. 96 well plate를 washing buffer로 씻어주고 biotin conjugated anti insulin과 혈청을 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 씻어주고 HRP conjugated streptavidin solution을 넣어 30분간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 씻어주고 substrate chromogen reagent를 넣고 30분간 반응시킨 후 reaction stopper를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 혈청 ml당 ng으로 나타내었다.

6) Total cholesterol 함량 측정

혈청의 total cholesterol 함량은 효소법²⁵⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고 total cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 dl당 mg으로 나타내었다.

7) HDL cholesterol 함량 측정

혈청의 HDL cholesterol 함량은 효소법²⁵⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 분리 시액 0.02 ml를 넣고 잘 섞어준 후 실온에서 10분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, HDL cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 dl당 mg으로 나타내었다.

8) Triglyceride 함량 측정

혈청의 triglyceride 함량은 효소법²⁶⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 10분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, triglyceride 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 dl당 mg으로 나타내었다.

9) Free fatty acid 함량 측정

혈청의 free fatty acid 함량은 효소법²⁷⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 효소 시액 I 1 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하고 효소 시액 II 0.5 ml를 넣고 잘 섞어준 후 다시 37°C에서 5분간 방치하여 파장 546 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, free fatty acid 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 l당 μ Eq으로 나타내었다.

10) Aldose reductase 활성 측정

Aldose reductase 활성은 Yamaoka 등의 방법²⁸⁾을 약간 변경하여 일정량의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 용액에 2 mM NADPH와 200 mM DL-glyceraldehyde 및 효소원을 첨가하여 25°C에서 5분간 반응시키는 동안에 DL-glyceraldehyde를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

11) Sorbitol dehydrogenase 활성 측정

Sorbitol dehydrogenase 활성은 Hollmann 등의 방법²⁹⁾에 준하여 일정량의 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.6) 용액에 기질인 105 mM D-fructose, 0.2 mM NADH 및 효소원을 첨가하여 25°C에서 5분간 반응시키는 동안에 D-fructose를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

12) ROS 측정

DCFDA assay³⁰⁾로 ROS를 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 96 well microplate에 조직 균질액과 DCFDA를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다.

13) 과산화지질 함량 측정

신장 조직의 지질 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals (HAE) 함량을 kit를 사용하여 측정하여 평가하였다. 검체 0.2 ml에 N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile 0.65 ml, Methanesulfonic acid 0.15 ml를 넣고 잘 섞어 준 후 45°C에서 60분간 방치하고 15,000 × g에서 10분간 원심분리하여 그 상층액의 흡광도를 파장 586 nm에서 측정하였으며, MDA+HAE 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 μ M으로 나타내었다³¹⁾.

14) Glutathione 함량 측정

조직 내 glutathione 함량 측정은 Ellman 등의 방법³²⁾에 따라 측정하였다. 조직 균질액을 1,000 × g에서 원심분리한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 1 mM DTNB 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 GSH 함량은 protein 1 mg 당 nmole로 나타내었다.

15) Advanced glycation endproducts (AGEs) 측정

잘게 조각낸 신장 조직을 chloroform : methanol (2:1) 혼합액에서 overnight하고, 0.1 N NaOH로 한 번 씻어준 뒤 0.1 N NaOH에 균질화시킨 것을 8,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 정량하여 1 mg/ml로 준비한다. 96 well microplate에 각 조직 균질액을 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 360 nm와 방출파장 465 nm에서 측정하였다.

16) Western blot analysis

마우스에서 적출한 신장 조직 균질액의 cytosol, nuclear 분획에서 단백질을 분리하여 발현을 관찰하였다. 동일 량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켜 주었다. 이 membrane을 분리한 후 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단시키고 각 타겟 단백질의 1차 antibody를 2시간 이상 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 60분간 세척한 다음 2차 antibody를 2시간 이상 반응시키고, TBST로 60분간 세척한 다음 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다.

17) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법³³⁾과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

18) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

실 험

1. 혈중 glucose 및 insulin에 미치는 영향

혈중 glucose 함량은 정상군에 비하여 대조군에서 급격하게 증가되었으나 桑椹子추출물을 7.5, 15, 30 mg/kg 투여한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다. 혈중 insulin 농도는 당뇨 대조군에서 15배 이상 높게 나타났으나 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Table 1).

Table 1. Effects of the Mori Fructus (MF) extracts on serum glucose and insulin levels in ob/ob mouse

	C57	ob/ob	ob/ob +MF 7.5	ob/ob +MF 15	ob/ob +MF 30
Glucose (mg/dl)	143.59±11.91	403.79±31.54 ^{a)***}	371.27±25.87	345.24±21.09 ^{b)*}	275.46±19.28 ^{b)***}
Insulin (ng/ml)	0.92±0.13	15.68±1.28 ^{a)***}	14.99±1.45	11.01±0.88 ^{b)***}	8.88±0.79 ^{b)***}

Mice were administrated MF (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (**: p < 0.01, *: p < 0.05)

2. 혈청 지질 함량에 미치는 영향

혈청 total cholesterol 함량은 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 증가되었으나 실험군에서는 농도 의존적으로 저하되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다. Triglyceride 함량은 대조군에서 유의하게 증가되었으나 30 mg/kg을 투여한 실험군에서 유의성이 인정되었으며, free fatty acid 함량은 유의성은 없었으나 감소되는 경향을 보였다. 혈청 HDL cholesterol 함량은 대조군에서 유의하게 감소되었으나 실험군에서는 농도 의존적으로 증가되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Table 2).

3. Aldose reductase 활성화에 미치는 영향

정상군의 aldose reductase 활성은 2.98±0.22 nmoles/min/mg protein이었으나 대조군에서는 4.78±0.41 nmoles/min/mg protein으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 각각 4.69±0.22, 4.41±0.41, 4.37±0.36 nmoles/min/mg protein으로 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 1).

Table 2. Effects of the Mori Fructus (MF) extracts on serum total cholesterol, triglyceride, free fatty acid and HDL cholesterol levels in mouse

	C57	ob/ob	ob/ob +MF 7.5	ob/ob +MF 15	ob/ob +MF 30
Total cholesterol (mg/dl)	150.84±12.46	221.22±20.74 ^{a)***}	213.58±17.17	198.56±18.88 ^{b)*}	175.31±3.27 ^{b)***}
Triglyceride (mg/dl)	64.59±4.15	122.46±13.68 ^{a)***}	122.38±12.01	114.58±10.53	106.77±7.38 ^{b)***}
Free fatty acid (μEq/l)	996.14±78.21	1605.57±98.19 ^{a)***}	1599.21±101.27	1569.59±99.87	1499.58±85.67
HDL cholesterol (mg/dl)	28.64±2.08	22.58±1.85 ^{a)***}	19.98±1.68	21.47±1.57 ^{b)***}	25.32±1.79 ^{b)***}

Mice were administrated MF (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (**: p < 0.01, *: p < 0.05)

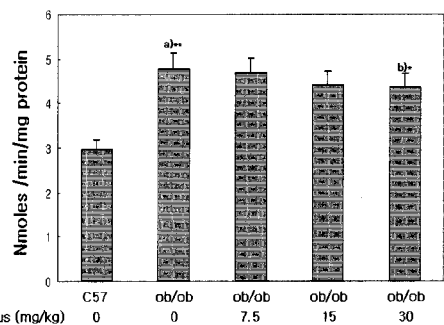


Fig. 1. Effect of Mori Fructus on aldose reductase level in mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (*: p < 0.05)

4. Sorbitol dehydrogenase 활성화에 미치는 영향

정상군의 sorbitol dehydrogenase 활성은 29.85±3.01 nmoles/min/mg protein이었으나 대조군에서는 57.29±5.10 nmoles/min/mg protein으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 각각 58.11±4.98, 54.27±4.71, 49.58±4.22 nmoles/min/mg protein으로 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 2).

5. ROS 생성에 미치는 영향

정상군의 ROS 생성은 22.31±2.01%였으나 대조군에서는 60.24±5.41%로 급격하게 증가되었으며, 실험군에서는 각각 58.88±5.18, 55.24±4.92, 49.01±4.13%로 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 3).

6. MDA+HAE 함량에 미치는 영향

정상군의 MDA+HAE 함량은 9.27±0.81 μmoles/mg protein 이었으나 대조군에서는 23.54±2.27 μmoles/mg protein으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 각각 22.64±0.21, 21.54±0.22, 20.14±0.18 μmoles/mg protein으로 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 4).

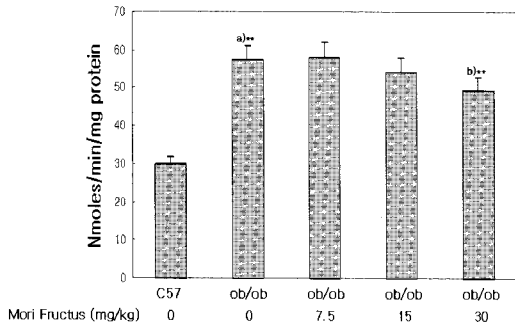


Fig. 2. Effect of Mori Fructus on sorbitol dehydrogenase level in mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01)

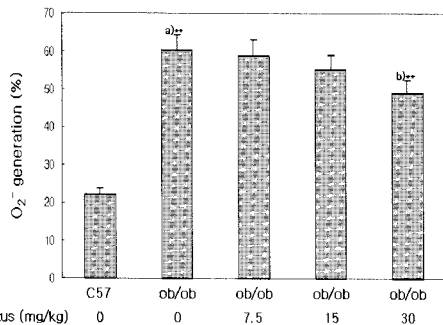


Fig. 3. Effect of Mori Fructus on reactive oxygen species generation in mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. The Generation of reactive oxygen species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01).

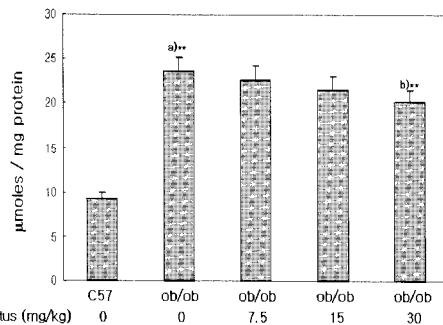


Fig. 4. Effects of Mori Fructus on MDA+HAE level in mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

7. Glutathione 함량에 미치는 영향

정상군의 glutathione 함량은 17.27±1.47 nmole/mg이었으나

대조군에서는 11.24±1.01 nmole/mg으로 유의하게 감소되었으며, 실험군에서는 각각 13.05±1.19, 16.58±1.49, 18.66±1.69 nmole/mg으로 농도 의존적으로 증가되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 5).

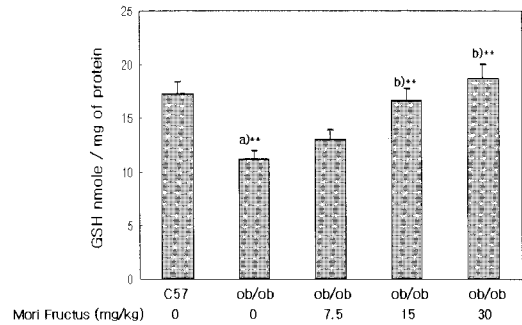
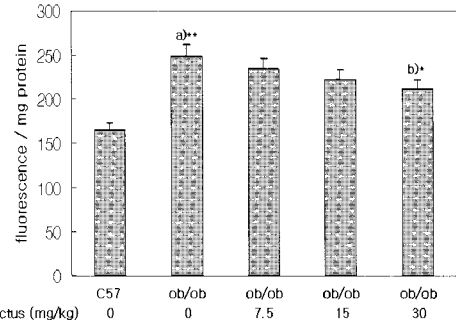


Fig. 5. Effect of Mori Fructus on glutathione level in mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different: from the normal. b) Significantly different: from the control (** : p < 0.01).

A.



B.

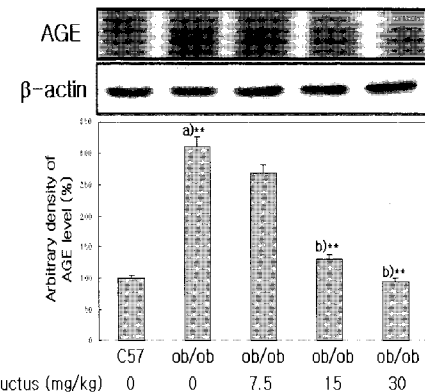


Fig. 6. Effect of Mori Fructus on AGEs content in mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05). A : AGEs generation in mouse kidney. B : Western blot was performed to detect AGEs protein level in cytosol fractions from mouse kidney.

8. AGEs 및 RAGE 단백질 양에 미치는 영향

형광으로 AGEs 함량을 측정된 결과 정상군에서 193.55±11.21 fluorescence/mg protein이었으나 대조군에서는 282.68±20.54 fluorescence/mg protein로 유의하게 증가되었으며,桑椹子추출물을 투여한 실험군에서는 각각 3.11±0.27, 3.11±0.27 fluorescence/mg protein으로 30 mg/kg 투

여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6A). Western blot으로 AGEs 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6B). RAGE 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7).

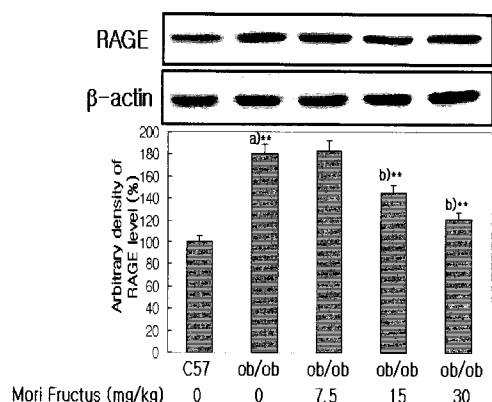


Fig. 7. Effect of Mori Fructus on RAGE expression in mouse kidney. Western blot was performed to detect RAGE protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated Mori Fructus (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

고찰

2형 당뇨병은 40세 이후, 특히 비만인 사람에서 발병하기 쉬운 질환으로 인슐린 저항성을 특징적으로 나타낸다. 인슐린 저항성에 대한 초기의 생리학적 적응은 β cell의 과다한 증식에 의한 고인슐린혈증이지만, 인슐린에 대한 말초 조직의 저항성을 극복 할만큼 충분한 인슐린을 분비하지 못하게 됨으로써 고혈당과 고인슐린혈증의 악순환을 반복한다. 결국 β cell의 과사, 인슐린 결핍증, 심한 고혈당, 체중 감소 등이 초래된다³⁴⁾.

인슐린 저항성은 유전적인 요인과 함께 말초조직에서 인슐린 감수성을 감소시키는 식이 형태나 비만, 운동 부족, 스트레스 등과 밀접한 관련이 있다^{2,34)}. 특히 비만은 전신적 지방산의 과잉 배출, 지방 조직의 팽창 및 미세 허혈 그리고 염증 반응들 간의 복잡한 상호 작용을 통해 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 제시되고 있다³⁵⁾.

본 실험에 사용된 桑椹子는 性味가 甘酸 寒하고 心肝腎經에 歸經하여 益腎固精 補血滋陰 生津潤燥 등의 효능으로 津傷口渴 內熱消渴 血虛便秘 頭暈耳鳴 心悸失眠 鬚髮早白 등의 치료에 활용되고 있다^{19,20)}. 이와 같이 桑椹子는 補腎滋陰의 要藥으로서 腎陰이 부족하여 발생하는 병증들의 치료제가 되므로 陰津이 虧損되어 발생하는 당뇨병의 예방과 치료에 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 또한 桑椹子는 비만을 억제하는 효과가 밝혀진 三精丸³⁶⁾을 구성하는 주된 약재이므로 비만의 예방과 치료에도 효과를 나타낼 것으로 여겨진다. 桑椹子의 성분은 carotene, vitamin (B1, B2, C), nicotinic acid, 당류, 유기산 등이 함유되어 있다^{19,20)}.

ob/ob 마우스는 유전적 고혈당 비만 마우스로서 3주령에서

부터 체중이 눈에 띄게 증가하여 80 g까지 도달하여 정상 마우스 (30-40 g)의 3배 가까이 된다. 체지방의 증가와 함께 인슐린 저항성이 나타나며 계속해서 고혈당과 고인슐린혈증을 보여 2형 당뇨병과 유사한 임상적 특성을 나타낸다³⁷⁾.

혈중 glucose 함량을 측정된 결과 ob/ob 마우스에서 현저하게 증가되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 15, 30 mg/kg 농도에서 유의하게 저하되는 것으로 나타났다. 이는 ob/ob 마우스에 順氣散을 투여한 실험¹⁷⁾에서 투여 1주부터 낮은 혈당을 유지하면서 투여 기간 내내 용량 의존적인 혈당 감하 효과를 보인 것과 유사한 결과이다. 또한 혈중 insulin 함량도 ob/ob 대조군에서 현저하게 증가되었으나 桑椹子추출물의 투여로 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 당뇨 대조군에서는 이전에 보고된 ob/ob 마우스의 특징과 일치하게 혈당의 증가와 함께 고인슐린혈증을 나타낸 것이며, 桑椹子추출물의 투여는 인슐린 수치를 농도 의존적으로 감소시킴으로써 인슐린 저항성과 고인슐린혈증을 개선시켜 혈당을 조절하는 것으로 생각된다.

지질 대사 장애는 2형 당뇨병과 긴밀한 연관을 가지고 있는데, 특히 높은 중성지방과 유리지방산은 골격근이나 지방 조직에서 인슐린 저항성과 밀접한 관련이 있다. 혈청 triglyceride는 각종 지방 조직의 주성분으로 생체의 에너지 저장에 관여하며 비만에서 증가되므로 지질 대사 이상의 해병에 중요한 지침이 된다. 혈청 free fatty acid는 총지방산의 4-5%에 지나지 않으나 주로 albumin과 결합하여 존재하며 말초 조직의 중요한 에너지원이 된다. 또한 비만, 당뇨병, 간질환에서 수치가 높기 때문에 비만의 정도가 심할수록 free fatty acid 함량이 증가하게 된다. HDL cholesterol은 말초 조직으로부터 cholesterol을 간으로 운반하여 제거하는 작용을 하여, 혈중 농도가 증가되면 동맥경화증을 예방할 수 있으나 감소되면 동맥경화증의 위험 신호가 된다. 본 실험 결과 ob/ob 마우스에서 총콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산 수치가 유의하게 증가되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 저하되는 것으로 나타났다. HDL cholesterol은 ob/ob 마우스에서 유의하게 감소되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다.

고혈당 상태가 지속되면 비정상적인 당대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 한층 가속화시킨다. Polyol pathway는 정상 상태에서는 활성화되어 있지 않으나 고혈당 상태에서 세포내로 유입된 많은 양의 포도당이 aldose reductase에 의해 sorbitol을 형성하고, 이후 sorbitol dehydrogenase에 의해 과당으로 전환되는 과정으로서 신경조직, 망막, 신장, 수정체 등에서 이루어진다. 세포 내에 과당이 축적되어 수분을 삼투압에 의해 끌어들이게 되는데, 이 과정에 의해 당뇨병의 합병증인 망막병증, 백내장, 신경합병증 등이 진행된다^{2,8,9)}. 본 실험 결과 ob/ob 마우스에서 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase 활성이 현저하게 증가되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 30 mg/kg 농도에서 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 이는 桑椹子추출물이 두 효소의 활성을 억제하여 polyol pathway의 비정상적인 작동을 정상적으로 조절해 줌으로써 oxidative stress로 인한 조직 손상을 억제시켜 당뇨병 합병

증의 발현을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

당뇨병과 같은 병리적 상태에서는 ROS의 생성이 증가될 뿐만 아니라 각종 방어 기전의 저하로 조직이 손상될 가능성이 높으므로 ROS의 생성은 만성 합병증 발생에 관여하는 주요 기전의 하나로 주목받고 있다. 본 실험 결과 ob/ob 마우스에서 ROS 생성이 현저하게 증가되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 30 mg/kg 농도에서 유의하게 감소되는 것으로 나타났다.

ROS에 의해 세포막의 불포화지방산의 지질과산화로 생성되는 부산물인 MDA와 HAE의 생성에 대한 영향을 검토한 결과 ob/ob 마우스에서 MDA+HAE 함량이 증가되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 30 mg/kg 농도에서 유의하게 감소되었다. 이는 桑椹子추출물의 ROS 소거 효과에 의해 세포막의 불포화지방산의 지질과산화를 억제함으로써 MDA+HAE가 저해된 것으로 생각된다.

Glutathione 함량에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob 마우스에서 유의하게 감소되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 15, 30 mg/kg 농도에서 유의성 있게 증가되었다. 桑椹子추출물은 glutathione을 증가시켜 ROS를 소거시키고 oxidative stress를 감소시킴으로써 당뇨병 합병증의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

당뇨병으로 인한 고혈당 상태와 유사한 고농도 포도당 조건이 지속되는 경우 AGE의 형성과 조직 축적 정도가 가속화되며, 당뇨병뿐만 아니라 요독증과 같은 질환의 혈관 병태 생리에 중요하게 관여하는 것으로 여겨지고 있다. AGEs는 포도당, 과당과 같은 당 물질이 단백질의 아미노산기와 비효소적 반응에 의해 가역적인 물질인 schiff base를 형성한 다음 조기 당화산물(amadori)을 형성하고, 고혈당 상태에서 amadori가 재배열되어 단백질과 교차 결합하여 생성된 비가역적 물질이다^{11,12}. AGE는 한 번 생성되면 혈당이 정상으로 조절되어도 분해되지 않고 단백질 생존 기간 동안 여러 조직과 세포에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다^{38,39}. 번역조직화학 연구를 통해 노령의 당뇨병 환자들의 심장과 동맥 뿐 아니라 피부, 폐, 신장, 장관, 척추간 디스크 등 다양한 조직에서 연령과 관련된 AGEs의 침착이 보고되었다⁴⁰. 당뇨병과 같은 병적인 상태에서 RAGE 발현이 증가하고 수 년 동안 증가 상태로 유지되는 positive feedback loop를 형성한다¹³.

AGEs 함량을 형광 분석을 통하여 측정한 결과 ob/ob 마우스에서 유의하게 증가되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 유의성 있게 감소되었다. Western blot에 의해 AGEs 단백질의 발현 정도를 관찰한 결과 ob/ob 마우스에서 증가되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 감소되는 경향을 보였다. AGEs receptor인 RAGE 단백질의 발현도 ob/ob 마우스에서 증가되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 감소되는 경향을 보였다.

본 실험의 결과를 종합해 보면, 桑椹子는 ob/ob 마우스에서 고혈당과 고인슐린혈증 및 고지혈증을 개선시키고 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 조절하고 활성산소를 소거시켜 oxidative stress를 감소시키며 AGEs와 RAGE 단백질 발현을 억제함으로써 당뇨병 및 그 합병증의 발생을 억제할 것

로 여겨진다.

결 론

桑椹子가 2형 당뇨병 및 그 합병증의 예방과 치료에 효과를 나타내는 지를 규명하기 위하여 ob/ob mouse에서 혈당 및 혈청 지질에 미치는 영향을 관찰하고 polyol pathway에 관여하는 효소의 활성, ROS 생성, AGEs 및 RAGE 단백질 등에 미치는 영향을 검토하였다.

ob/ob mouse에서 혈중 glucose 함량과 insulin 농도가 유의하게 증가되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 유의성 있게 감소되었다. 혈청 중 total cholesterol, triglyceride 및 free fatty acid 함량은 ob/ob mouse에서 유의하게 증가되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 유의하게 감소되었으며, HDL-cholesterol 함량은 ob/ob mouse에서 유의하게 감소되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다. ob/ob mouse에서 aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성이 유의하게 증가되었으나 桑椹子추출물 투여로 억제되었다. ROS 생성은 ob/ob mouse에서 증가되었으나 桑椹子추출물 투여에 의해 유의성 있게 저하되었다. ob/ob mouse에서 MDA+HAE 함량이 증가되고 glutathione 함량이 감소되었으나 桑椹子추출물을 투여한 경우에 유의하게 개선되었다. 桑椹子추출물은 ob/ob mouse에서 증가된 AGEs 및 RAGE 단백질 양을 감소시켰다.

이러한 실험 결과는 桑椹子가 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 조절하고 활성산소를 소거시켜 oxidative stress를 감소시키고 AGEs와 RAGE 단백질을 감소시킴으로써 당뇨병 및 그 합병증의 발생을 억제할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kahn, C.R. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 34: 145-160, 1985.
2. 김응진 외. 당뇨병학. 서울, 고려의학, pp 15-43, 32-33, 149-169, 391-468, 475-487, 609-616, 1998.
3. Carmine, M., Giuseppe, L., Bruno, T. Insulin resistance and cardiovascular risk ; New insight from molecular and cellular biology. *Trends cardiovasc Med.* 16: 183-188, 2006.
4. Clay, F.S. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 116: 1813-1822, 2006.
5. Cai, H., Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-844, 2000.
6. Matsubara, T., Ziff, M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 137: 3295-3298, 1986.
7. Hammers, H.D., Martin, S., Fedesrlin, K., Geisen, K. and Brownlee, M. Aminoguanidine treatment inhibit the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc*

- Natl Acad Sci USA. 88: 11555-11558, 1991.
8. Pugliese, G., Tilton, G.T. and Williamson, J.R. Glucose-induced metabolic imbalance in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev.* 7: 35-59, 1991.
 9. Stevens, M.J., Dananberg, J., Feldman, E.L., Lattimer, S.A., Kamijo, M., Thomas, T.P., Shindo, H., Sima, A.A. and Greene, D.A. The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and Na-K-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. *J Clin Invest.* 94: 853-859, 1994.
 10. Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Sposito, C., Hegarty, H., Hurley, W. and Claus, M. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung tissue which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 267: 14987-14997, 1992.
 11. Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H.N. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *Engl J Med.* 318: 1315-1321, 1988.
 12. Nepper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C.E., Ellisot, K., Stern, D. and shaw, A.J. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Biol Chem.* 267: 14998-15004, 1992.
 13. Schmidt, A.M., Yan, S.D., Wautier, J.L. and Stern, D. Activation of receptor for advanced glycosylation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 84: 489-497, 1999.
 14. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, p 477, 1986.
 15. 余永譜. 中醫治療內分泌代謝疾病. 浙江, 浙江科學技術出版社, p 239, 243, 1992.
 16. 강석봉. 消渴의 傳變證과 당뇨병의 만성합병증에 대한 비교 고찰. *대한한의학회지* 19(2):137-152, 1998.
 17. 한기선. ob/ob mice에서 順氣散의 항당뇨 활성 및 기전 연구. *경희대학교 대학원 석사학위논문*, 2002.
 18. 한상태, 정지천. 清血散이 ob/ob mouse의 혈당, 고지혈증, Polyol Pathway 및 Reactive Oxygen Species에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 22(2):350-356, 2008.
 19. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 上海, 上海科學技術出版社, pp 1967-1968, 1983.
 20. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울, 永林社, pp 598-599, 1991.
 21. 라정찬, 배진희, 박형근, 김성훈, 강경선. 당뇨 환자를 위한 새로운 식이요법에 관한 연구. *동의생리병리학회지* 17(1): 130-135, 2006.
 22. 박용기, 강병수. 桑椹子の 항산화작용에 관한 연구. *대한본초학회지* 14(2):43-50, 1999.
 23. 황금희. 상심자(Morus alba)의 운동능력 향상과 스트레스 개선 효과. *한국식품과학회지* 37(1):95-102, 2005.
 24. Thomson, R.H. Colorimetric glucose oxidase method for blood glucose. *Clin Chem Acta.* 13: 133-135, 1966.
 25. Levinson, S.S. Use of an enzymatic method for cholesterol, designed for continuous flow instrumentation, with discrete bichromatic and centrifugation analysis. *Clin Chem.* 23: 2335-2337, 1977.
 26. Flether, M.J. A colorimetric method for estimation serum triglyceride. *Clin Chem.* 22: 393, 1968.
 27. 金井泉 외. 臨床検査法概要. 동경, 금원. p 467, 1983.
 28. Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J. and 3Kokai, Y. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia.* 38: 255-261, 1995.
 29. Hollmann, S. In Hoppe-Seyler Thiefelder : *Handbuch der physiol. und path.-chem.* Vol. VIa. Berlin-Heidelberg-New York:Analyse, Springer. p 704, 1964.
 30. Cathcart, R., Schwiers, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 134: 111-116, 1983.
 31. Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyde and Related Aldehydes. *Free Rad Biol Med.* 11: 81-128, 1991.
 32. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl group arch. *Biochem Biophys.* 82: 70-77, 1959.
 33. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275, 1951.
 34. Polonsky, K.S. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus. A genetically programmed failure of the β cell to compensate for insulin resistance. *New Engl J Med.* 334: 777-783, 1998.
 35. Steinberg, G.R. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle.* 6: 888-894, 2007.
 36. 정해주, 김세윤, 정지천. 고지방 식이 흰쥐의 비만에 미치는 三精丸의 영향. *대한한의학회지* 27(3):516-527, 2006.
 37. Eleazar, S. Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes metabolism reviews.* 8(3):179-208, 1992.
 38. Vinson, J.A. and Howard, T.B. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic and other vitamins and nutrients. *Nutritional*

- Biochemistry. 7: 659-663, 1996.
39. Smith, P.R. and Thornalley, P.J. Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions. Eur J Biochem. 210: 729-739, 1992.
40. Schleicher, E.D., Wagner, E., Nerlich, A.G. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. J Clin Invest. 99(3):457-468, 1997.