

Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 당뇨 증상 개선에 미치는 한약재 첨가 청국장 추출물의 영향

조창숙[#], 김소영, 최문열, 김미형, 고경아, 김미려, 서부일^{*}

대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Effects of Herbal Medicine-added Cheonggugjang extract on Improvement of the Symptoms in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Chang Suk Jo[#], So Young Kim, Moon-Yeol Choi, Mi Hyung Kim, Kyung A Ko
Mi Ryeo Kim, Bu-il Seo^{*}

Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea

ABSTRACT

Objective : This study was conducted to investigate antidiabetic effects of chunggugjang with medicinal herbal complex (CJ) in streptozotocin (STZ)-induced animal models.

Method : STZ (65 mg/kg) was injected intraperitoneally to induce diabetes. Then rats were divided into 5 groups ; NG (normal diet + 0.9% saline), COS (STZ +saline 5 mL/kg), COB (STZ + fermented soybean(100 mg/kg), CJ 100/200 (STZ+CJ(100 and 200 mg/kg), CJ 300/600 (STZ+CJ(300 and 600 mg/kg). 4 weeks later, oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. After sacrificing rats, serum levels of blood urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) were measured and histological changes were observed.

Result : Body weight change and food efficiency ratio (FER) were decreased in the CJ 300/600 group than in the COS group. But, there was no change in water intake. Serum levels of glucose, AST, ALT and BUN were lower in the CJ 300/600 group than in the COS group. Also, TG, TC, and creatinine were decreased in the CJ 300/600 group than in the COS group. According to OGTT, 120 minutes postprandial glucose levels were lower in the CJ 300/600 group than in the COS group. In addition, administration of CJ extracts restored histopathological damage.

Conclusion : The results suggest that CJ can be used as a functional material for diabetes treatment as it has the effect to improve pathological symptoms in STZ-induced diabetic rats.

Key words : Cheonggugjang, streptozotocin-induced, diabetes, fasting blood glucose, oral glucose tolerance test

*Corresponding author : Bu-il Seo and Mi Ryeo Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-819-1876 · E-mail : seojangsan@naver.com

#First author : Chang Suk Jo, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241 · E-mail : lcl53@hanmail.net

· Received : 13 June 2022

· Revised : 21 July 2022

· Accepted : 25 July 2022

I. 서론

식문화와 생활 양식의 서구화로 열량 부족이 사라지고 삶은 유택해졌으나 과다한 열량 섭취와 육류 및 동물성 식품의 섭취가 증가되면서 서구 사회에서 발병률이 높은 비만과 함께 심혈관질환, 고혈압, 고지혈증, 저 HDL 콜레스테롤혈증의 발생률이 증가하고 있다¹⁾. 대사성 증후군의 하나인 당뇨병은 인슐린의 부족으로 인해 혈중 포도당 농도가 정상치 이상으로 증가하여 소변으로 포도당이 배출되는 질환으로서 크게 제 1형의 인슐린 의존성 당뇨병과 제 2형의 인슐린 비의존성 당뇨병으로 나뉜다. 유전적 요인으로 발병하는 제 1형 당뇨병은 췌장 내 자가 면역 베타 세포 파괴로 인해 인슐린 생성이 결핍된 것이 특징이며, 환경적인 요인의 영향을 많이 받는 것으로 알려진 제 2형 당뇨병은 인슐린 작용에 대해 비정상적으로 증가된 저항성과 신체가 저항성을 극복하기에 충분한 인슐린을 생산할 수 없을 때 발생한다. 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 80%가 비만을 가지고 있었으며, 복부비만의 비중이 클수록 제 2형 당뇨병의 발생 빈도가 증가하는 것으로 보고되었다²⁾. 오랜 기간 동안 고혈당 상태로 지내면 혈관 벽이 손상되어 각종 합병증을 일으킬 수 있는데, 당뇨병으로 인한 합병증을 줄이기 위해 생활 습관을 개선하고 적절한 약물 복용이 중요하다^{3,4)}. 그러나 장기적으로 약물을 복용하게 되면 간독성, 저혈당, 복부팽만감 등의 부작용을 유발하게 된다⁵⁾

한국의 전통 음식인 청국장에는 대두를 발효시켜 만든 대표적인 발효식품으로 혈당치를 조절하는 isoflavone 및 soyasaponin 성분이 풍부하게 들어있어 '내당능(耐糖能)'이 개선되고 인슐린 저항성이 완화되는 등 2형 당뇨병 예방에 효과인 것으로 알려져 있으므로 혈당조절이 안 되는 당뇨병자들의 혈당개선에 탁월하다^{6,7)}. 또한 청국장이 발효되면서 제니스틴에서 당이 떨어져 만들어지는 제니스테인 성분은 여성호르몬인 에스트로겐과 구조가 비슷해 월경주기 조절, 골다공증, 유방암, 폐경기 등의 예방에 도움을 준다고 알려져 있다⁸⁾. 인슐린과 유사한 구조의 물질을 가지고 있는 국우(菊芋)는 혈당의 상향조절 작용이 있어 저혈당인 환자와 고혈당인 환자를 동시에 치료할 수 있는 물질이라고 알려져 있으며^{9,10)}, 맥문동(麥門冬)과 구기자는 식후 혈당강하, 콜레스테롤, 당화혈색소 (HbA1c) 수치 감소 및 항당뇨의 효능이 보고되었다^{11,12)}. 또한 당뇨병 유도 동물 모델에서 산약에서 추출한 dioscorans가 항당뇨 및 항산화 효과가 있다는 연구 결과가 있다¹³⁾. 그러나 대사성 질환의 위험을 높이는 식습관 요인 중 하나로 나트륨의 과잉 섭취가 포함되어 있다¹⁴⁾. 이에 본 연구에서는 염분을 배제하고, 국우(菊芋), 맥문동, 구기자 및 산약 등을 첨가하여 제조한 대두발효복합물을 streptozotocin (STZ)으로 당뇨가 유발된 흰 쥐에 4주간 경구 투여한 다음, 당뇨 증상에 미치는 영향을 알아보았다.

II. 재료 및 실험 방법

1. 시료의 제조

1) 재료 구입 및 전처리

실험에 사용된 추출기는 경서 기계 산업 추출기 (COSMOS-660)를 사용하였으며, 동결건조는 일신랩 (PVTFD 10R) 기기를 사용하였다. 본 실험에 사용된 청국장 (Chunggugjang, CJ)은 초빈치유농업(주) (경북, 포항)에서 제조한 것을 사용하였다. 불리지 않은 대두 1 kg을 세척한 다음 분쇄하여 곱게 분말화된 맥문동, 구기자, 국우 (돼지감자), 산약 (마), 초록콩나물, 건 대파, 표고버섯 가루 각각 10 g, 영지버섯 3 g 과 3 L를 가하고, 센 불에서 30분, 약불에서 1시간 삶았다. 삶아진 대두는 30℃로 식힌 다음, 공기 소통이 잘 되도록 구멍이 난 채반에 젖은 면보를 깔고 7cm 미만으로 균일하게 고르게 퍼 주었다. 편평한 대두 위에 건강을 여기저기 꽂아 주고, 별도로 준비한 젖은 면보를 채반 위에 덮어서 과도한 수분 증발을 막아 주었다. 추가로 구멍이 없는 채반을 준비하여 벗짚과 맥문동, 구기자, 국우 (돼지감자), 산약, 대파, 콩나물, 표고버섯은 각각 10 g, 영지버섯 3 g을 골고루 혼합하고 퍼주었다. 여기에 앞서 준비해 주었던 삶은 콩이 담긴 채반을 포개듯이 엮어서 28~42℃에서 28시간 발효하고, 연이어 1~2℃에서 5일간 발효시켰다. 발효를 마친 대두에 또 다시 맥문동, 구기자, 국우 (돼지감자), 산약, 대파, 콩나물, 표고버섯 가루를 각각 10 g, 초록콩나물 가루를 20 g 넣은 무염분 청국장을 제조하였다. 제조된 청국장은 원료 2 kg에 8배수만큼의 증류수를 가하고 100℃에서 2시간 추출하고 농축한 다음, 동결 건조하여 9.26% 수득율의 분말을 얻은 후 실험에 사용하였다.

2) 일반성분 분석

실험에 사용된 CJ의 일반성분 분석은 대구한의대학교 바이오 융·복합 시험센터 (경북, 경산)에 의뢰하여 수분, 회분, 조지방, 조단백질, 당류 (glucose, sucrose, maltose 및 총 당류)의 함량을 분석하였으며, 조섬유 함량은 계명대학교 전통 미생물 자원개발 및 산업화 연구센터 (대구, 달서구)에 의뢰하여 분석하였다 (Table 1.).

Table 1. Analysis of general components in Chunggugjang (CJ) and boiled bean extract (COB).

(g/100g)	COB	CJ
Moisture	63.38	60.85
ash	1.59	1.9
Crude fat	2.58	3.48
Crude Protein	17.83	15.57
Fructose	0.21	-
Sucrose	0.77	0.05
Glucose	-	0.18
Maltose	-	0.11
Total Sugar	0.97	0.33
Crude Fiber (%)	4.649	9.302

2. 실험 방법

1) 실험동물

실험동물은 (주)효창 사이언스에서 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (200-220 g) 7주령을 분양 받아 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 동안 일반 고형사료 (효창사이언스(주), 한국)와 물을 자유 섭취시켰으며, 명암은 12시간 (day light 07:00 ~ 19:00)을 주기로, 일정한 환경 (온도: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도: $50 \pm 10\%$)을 실험 종료 시까지 일정한 사육조건을 유지시키면서 실험하였다.

2) 당뇨 유발 및 확인

Bond 등의 방법¹⁵⁾을 변형 및 보완하여 실험동물에서 당뇨를 유발하였다. streptozotocin (STZ, Sigma, 미국)을 0.1 M citrate buffer (4°C)에 녹여 65 mg/kg body weight (bw) 용량으로 1주일간 적응이 완료된 흰쥐에게 1회 복강 내 주사하여 당뇨를 유발시켰다. 공복 혈당수치가 250 mg/dl 이상시 당뇨병이 유발된 것으로 간주하고, 이를 뒤 12시간 이상 실험동물을 절식시킨 후 STZ 투여 3일째에 혈당측정점사지 (Accu-check, Roche diagnostics gmbH, 독일)를 이용하여 꼬리정맥에서 공복혈당을 채혈 후 당뇨병이 유발된 개체를 선별하여 대조군과 실험군으로 구분하여 실험에 사용하였다.

3) 시료 투여

당뇨가 유발된 실험동물을 난괴법에 의해 각 군당 6마리씩, 5군으로 구분하였다. 정상군(normal group, NG; n=6)과 STZ 투여로 당뇨가 유발된 대조군 (COS ; STZ + saline 5 mL/kg, COB ; STZ + 삶은 콩 추출물 100 mg/5 mL per kg, CJ 저 농도군 (CJ 100/200; STZ + CJ 100~200 mg/5 mL per kg), CJ 고 농도군 (CJ 300/600; STZ + CJ 300~600 mg/5 mL per kg)으로 나누었다. 본 연구의 CJ 투여 농도는 당뇨한약복합처방군을 활용한 연구에서 600 mg/kg의 용량 투여에도 간에 독성을 나타내지 않았다는 연구 결과를 참고하여¹⁶⁾ 설정하였다. 시료는 매일 1회 일정한 시간에 총 4주간 경구 투여하였고, 정상군과 당뇨 유발 대조군에는 실험군과 동량의 생리식염수를 경구 투여하였으며, 4주 투여기간 중 초기 2주 동안에는 2개의 실험군에 CJ를 100 또는 300 mg/kg 용량으로 경구투여를 하였고, 후기 2주 동안은 각각 2배 용량인 200 또는 600 mg/kg으로 경구 투여하였다.

4) 체중, 음수량 및 사료섭취량 측정

실험기간 동안 1일 1회 일정한 시간에 체중 및 음수량을 측정하였으며, 꼬리 혈당은 매주 1회 12시간 이상 공복 후 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기를 이용해 분석하였다. 식이효율 (food efficiency ratio, FER)은 체중 증가량 (g)/식이 섭취량 (g)으로 계산하여 산출하였다.

5) 경구당부하검사 (OGTT)

경구당부하검사는 실험 시작 4주가 되는 28일째 시행하였다. 모든 동물을 12시간 이상 절식시키고 꼬리정맥에서 혈당을 측정 후 2 g/kg농도의 glucose를 경구 투여한 직후 30분,

60분, 120분 후에 꼬리 정맥혈로부터 혈액을 채취하여 혈당 측정기를 이용하여 측정하였다.

6) 실험동물 처치

실험 종료 후 실험동물을 12시간 이상 절식시키고 isoflurane (JW pharmaceutical, 한국)를 흡입시켜 마취시킨 다음, 심장으로부터 혈액을 채혈하였다. 혈액은 3,000 rpm에 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, -80°C 에 보관한 후 혈액 마커 분석을 위해 사용하였다. 또한 간, 신장, 췌장 및 양쪽 뒷다리 가자미근 근육조직을 즉시 적출하여 표면의 수분을 제거한 후 미세저울 (XB 220A, Precisa, 스위스)을 이용하여 각각 조직 무게를 측정하였다. 간 및 신장 조직은 10% formalin (Junsei chemical, 일본)용액에 고정한 후 H&E 분석에 사용하였다.

7) 혈액분석

혈액으로부터 분리한 혈청은 혈액자동분석기 (IDEXX Vet test®8008, 미국)를 사용하여 중성지질 (triglyceride, TG), 총콜레스테롤 (total-cholesterol, TC) 및 고밀도콜레스테롤 (HDL-cholesterol, HDL-C), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) 및 creatinine을 측정하였다. 인슐린 농도는 rat insulin ELISA kit (Crystal Chem, 미국)를 이용하여 측정하였다. 저밀도콜레스테롤 (LDL-cholesterol, LDL-C) 및 동맥경화지수 (atherogenicindex, AI)는 다음 공식에 의해 계산되었다.

$$\text{LDL} = ([\text{Total-cholesterol}] - [\text{HDL-cholesterol}]) - (\text{Triglyceride}/5)$$

$$\text{AI} = ([\text{Total-cholesterol}] - [\text{HDL-cholesterol}]) / [\text{HDL-cholesterol}]$$

8) 조직병리학적 관찰

오¹⁷⁾ 등의 방법을 참고하여 각 조직의 병리학적 변화를 관찰하기 위하여 H&E 염색을 수행하였다. 췌장, 신장, 간 조직을 차가운 PBS로 수세한 후 4%의 PFA (paraformaldehyde)에 24시간 동안 고정하고, 파라핀 포매 과정 후 microtome을 이용하여 3 μm 두께로 박절하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 각 조직의 hematoxylin & eosin stain 염색을 위해 조직 슬라이드를 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 2~3분간 염색한 후 탈수과정을 거쳐 mounting 과정을 시행한 후 광학현미경 (EVOS M5000, ThermoFisher Scientific)을 이용하여 조직학적 변화를 200배로 관찰하였다¹⁸⁾.

9) 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 통계 프로그램 SPSS statistics (v. 25.0)를 이용하여 산출되었으며, 각 군 간의 평균 차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다. 각 군 간의 차이는 least significant difference

test를 사용하여 각 군 간의 통계적 유의성 검증을 실시하였다. 모든 결과는 mean±SD로 표시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 한약재 첨가 청국장 (CJ)의 투여가 당뇨 유발 흰쥐의 체중, 음수량 및 식이섭취량에 미치는 영향

당뇨 유발 동물 모델에서 한약재 첨가 청국장 추출물을 4주

간 투여 후 체중과 음수량, 식이 섭취량을 변화를 측정하였다. 4 주후 당뇨를 유발하지 않은 NG군에서는 약 5 g 증가하였으나, COS군은 약 3.1 g, COB군은 약 2.6 g, CJ 100/200군 약 1.6 g 그리고 CJ 300/600군에서는 약 1.3 g 감소하였다. 식이 섭취량은 NG군에 비해 COS, COB, CJ 100/200 및 CJ 300/600군이 약 두 배 정도 증가하였으며, CJ 300/600군에서 COS군에 비해 식이섭취량이 유의적으로 감소되었다. 음수량 또한 마찬가지로 NG군에 비해 COS, COB, CJ 100/200 및 CJ 300/600군에서 약 5배 증가하였으며, CJ 100/200 및 CJ 300/600군에서 COS군에 비해 음수량이 감소되는 경향만 나타났다. 식이 효율은 NG군에 비해 COS군과 COB군 CJ 100/200 및 CJ 300/600군에서 유의적으로 감소하였으며 대조군과 CJ 투여군 간의 차이는 보이지 않았다 (Table 2.).

Table 2. Effects of CJ on body weight gain, food intake, water intake and food intake ratio in STZ-induced diabetic rats.

	Diabetic groups				
	NG	COS	COB	CJ 100/200	CJ 300/600
Body weight gain (g/day)	5.09±1.03	-3.01±1.03 ^{###}	-2.62±0.53 ^{###}	-1.69±1.21 ^{###}	-1.39±0.78 ^{###,*,\$}
Food intake (g/day)	3.49±0.16	6.91±0.48 ^{###}	6.72±0.38 ^{###}	6.10±0.66 ^{###,**,\$}	6.00±0.57 ^{###,**,\$}
Water intake (mL/day)	6.94±0.52	36.98±1.98 ^{###,\$§}	33.73±1.43 ^{###,**}	33.82±2.54 ^{###,***}	31.64±1.13 ^{###,***,\$}
FER	1.53±0.40	-0.39±0.24 ^{###}	-0.35±0.06 ^{###}	-0.31±0.26 ^{###}	-0.29±0.11 ^{###}

NG : Normal group, COS : STZ + Salin 5 ml/kg, COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/5 mL. Data expressed as the mean±SD (n =6). *P < 0.05, **P < 0.01, and ###P < 0.001 vs. the NG group ; P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 vs. COS group ; P < 0.05, §P < 0.01, \$\$\$P < 0.001 vs. COB group.

2. 한약재 첨가 청국장 (CJ)의 투여가 당뇨 유발 흰쥐의 공복혈당 변화에 미치는 영향

4주 동안 NG군은 혈당을 지속적으로 유지하는 반면 COS 군에서는 당뇨유발 직후 공복혈당 수치가 504.71±64.34

mg/dl, COB군에서는 504.00±54.49 mg/dl, CJ 100/200 군에서는 502.13±52.95 mg/dl, CJ 300/600군에서는 504.00±50.47 mg/dl로 NG군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 4주 후 COS군과 COB군에 비해 CJ 300/600군에서 공복혈당이 유의하게 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

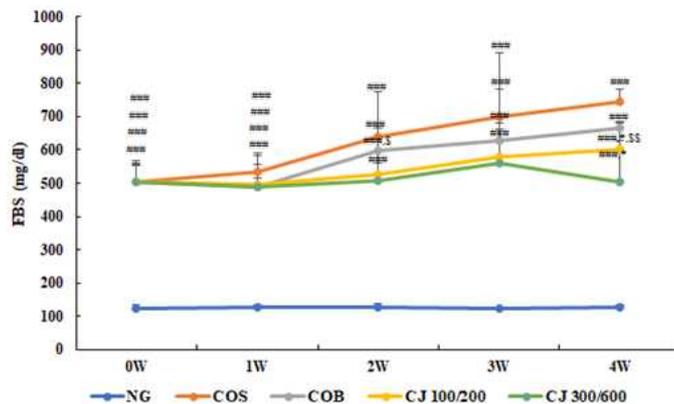


Fig. 1. The effect of CJ on fasting blood glucose in STZ-induced diabetic rats.

NG : Normal group, COS : STZ + Salin 5 ml/kg, COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/5 mL. Data expressed as the mean±SD (n =6). *P < 0.05, **P < 0.01, and ###P < 0.001 vs. the NG group ; P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 vs. COS group ; P < 0.05, §P < 0.01, \$\$\$P < 0.001 vs. COB group.

3. 한약재 첨가 청국장 (CJ)의 투여가 당뇨 유발 흰쥐의 조직무게에 미치는 영향

4주 후 실험동물을 희생하고 간, 신장, 췌장 및 근육 조직 무게를 측정된 결과 NG군에 비해 COS군과 COB군에서 간, 신장 및 췌장 무게는 모두 유의적으로 증가하였으며, 근육 무

게는 유의적으로 감소하였다. CJ 100/200 및 CJ 300/600군에서는 NG군에 비해 간, 신장 무게가 유의적으로 증가하였으나 췌장 무게는 차이를 나타내지 않았으며, 근육 무게는 유의적으로 감소하였다. 또한 CJ 300/600군에서는 COS군과 COB군에 비해 간 및 췌장 무게가 유의적으로 감소하였다 (Table 3.).

Table 3. The effects of CJ on organ weights in STZ-induced diabetic rats.

(g/100g body weight)	Liver	Kidney	Pancreas	Muscle
NG	2.58±0.20	0.68±0.06	0.36±0.05	1.28±0.15
COS	3.71±0.20 ^{###}	1.10±0.06 ^{###}	0.38±0.07	1.01±0.07 ^{##}
COB	3.55±0.19 ^{###}	1.04±0.08 ^{###}	0.37±0.04	1.04±0.12 ^{##}
CJ 100/200	3.75±0.27 ^{###}	1.09±0.10 ^{###}	0.42±0.04	0.93±0.07 ^{###}
CJ 300/600	3.32±0.30 ^{###, **}	1.05±0.07 ^{###}	0.41±0.22	0.89±0.25 ^{###}

NG : Normal group, COS : STZ + Salin 5 ml/kg, COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/ 5 mL. Data expressed as the mean±SD (n =6). [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01, and ^{###}P < 0.001 vs. the NG group ; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, and ^{***}P < 0.001 vs. COS group ; [§]P < 0.05, ^{§§}P < 0.01, ^{§§§}P < 0.001 vs. COB group.

4. 한약재 첨가 청국장 (CJ)의 투여가 당뇨 유발 흰쥐 혈액생화학적 변화에 미치는 영향

혈청 내 지질함량 측정결과, 중성지방 (triglyceride, TG)은 COS군 170.50±20.49 mg/dl, COB군 107.44±24.41 mg/dl, CJ 100/200군 116.81±15.22 mg/dl로 NG군 51.25±0.32 mg/dl보다 유의적으로 증가하였으며, CJ 300/600군은 NG군과 비슷한 수치로 나타났다. 총 콜레스테롤 (total-cholesterol, TC)은 COS군은 96.40±11.41 mg/dl, COB군에서는 85.05±6.53 mg/dl, CJ 100/200군은 86.39±8.69 mg/dl로 NG군 73.92±9.96 mg/dl에 비해 유의적으로 증가하였으며, CJ 300/600군 60.92±7.43 mg/dl에서는 NG군보다 유의적으로 낮게 나타났다. HDL-cholesterol (HDL-C)은 각 군 간에 차이가 나타나지 않았으며, LDL-cholesterol (LDL-C)은 NG군에 비해 COS군 16.94±1.50 mg/dl와 CJ 100/200군 21.95±6.69 mg/dl, CJ 300/600군 14.35±4.14 mg/dl로 낮게 나타났으며, COB군은 25.56±4.80 mg/dl로

높게 나타났다. 동맥경화수치를 계산한 결과 NG군 0.95±0.21 mg/dl에 비해 COS군 1.25±0.31 mg/dl, COB군 1.22±0.57 mg/dl로 증가하였고, CJ 100/200 및 CJ 300/600군에서는 각각 1.09±0.25 mg/dl 및 0.74±0.21 mg/dl로 감소하였다. 혈청 인슐린의 측정 결과, NG군 0.14±0.04 ng/mL에 비해 COS군은 0.06±0.03 ng/mL, COB군은 0.06±0.03 ng/mL, CJ 100/200군 0.07±0.03 ng/mL에서 유의적으로 감소하였고, CJ 300/600군에서는 NG군과 비슷한 수치로 회복되었다. 간수치를 나타내는 지표인 AST 및 ALT 수치는 NG군에 비해 COS군과 COB군이 유의적으로 증가하였으며, CJ 투여시 COS군에 비해 AST 및 ALT 수치가 감소되는 경향이 나타났다. BUN은 NG군에 비해 COS군에서 약 7배 증가되었으며, COS군에 비해 COB군 및 CJ 100/200, CJ 300/600군이 유의적으로 감소되었다. Creatinine 수치는 NG군 0.28±0.08 mg/dl보다 CJ 100/200 및 CJ 300/600군에서 유의적으로 감소되었다 (Table 4, 5.).

Table 4. The effects of CJ on serum lipid profiles in STZ-induced diabetic rats.

	(mg/dl)					(ng/mL)
	Serum	TG	TC	HDL-C	LDL-C	AI
NG	51.25±10.32	73.92±9.96	38.17±6.45	22.02±4.19	0.95±0.21	0.14±0.04
COS	170.50±20.49 ^{###, §§§}	96.40±11.41 ^{###}	40.67±3.88	16.94±1.50	1.25±0.31	0.06±0.03 ^{###}
COB	107.44±24.41 ^{###, ***}	85.05±6.53	38.93±6.24	25.56±4.80	1.22±0.57	0.06±0.04 ^{###}
CJ 100/200	116.81±15.22 ^{###, **}	86.39±8.69 [#]	40.75±7.10	21.95±6.69 [*]	1.09±0.25	0.07±0.03 ^{###}
CJ 300/600	55.57±23.35 ^{***, §§}	60.98±7.43 ^{#, ***, §§§}	40.53±6.24	14.35±4.14 ^{#, §§}	0.74±0.21 ^{*, §}	0.12±0.02 ^{*, §§}

NG : Normal group, COS : STZ + Salin 5 ml/kg, COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/ 5 mL. Data expressed as the mean±SD (n =6). [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01, and ^{###}P < 0.001 vs. the NG group ; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, and ^{***}P < 0.001 vs. COS group ; [§]P < 0.05, ^{§§}P < 0.01, ^{§§§}P < 0.001 vs. COB group.

Table 5. The effects of CJ on serum functional enzyme levels in STZ-induced diabetic rats.

Serum	(U/L)		(mg/dL)	
	AST	ALT	BUN	Creatinine
NG	154.00±15.84	55.83±9.22	12.50±1.52	0.25±0.06
COS	781.50±99.30 ^{###, \$\$\$}	352.50±71.32 ^{###, \$\$\$}	71.00±8.08 ^{###}	0.23±0.15
COB	445.00±69.48 ^{###, ***}	216.50±54.32 ^{###, ***}	65.50±13.99 ^{###}	0.23±0.10
CJ 100/200	377.00±50.08 ^{###, ***}	214.40±24.55 ^{###, ***}	63.20±12.30 ^{###}	0.22±0.04
CJ 300/600	346.00±80.72 ^{#, ***}	196.67±58.97 ^{###, ***}	44.00±11.14 ^{###, **, \$}	0.20±0.10

NG : Normal group, COS : STZ + Salin 5 ml/kg, COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/ 5 mL. Data expressed as the mean±SD (n =6). [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01, and ^{###}P < 0.001 vs. the NG group ; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, and ^{***}P < 0.001 vs. COS group ; ^{\$}P < 0.05, ^{\$\$}P < 0.01, ^{\$\$\$}P < 0.001 vs. COB group.

5. 한약재 첨가 청국장 (CJ)의 투여가 당뇨 유발 흰쥐의 경구당부하검사에 미치는 영향

STZ로 유발된 당뇨 쥐에 CJ의 경구 투여 시 경구당부하검사에 미치는 영향을 알아보기 위해 공복 후 2 g/kg 농도의 glucose를 경구 투여 한 다음, 30, 60 및 120분 후 꼬리혈당을 측정된 결과 NG군에서는 glucose 투여 30분 후 혈당이 최고치 (60.81±17.38)가 되고, 그 후 혈당이 지속적으로 감소하는 것을 확인하였다. COS군에서는 투여 60분 후 가장 높은 혈당

수치 (266.24±141.25)가 나타났으며 120분 후에 glucose 투여 전과 비슷한 수치로 감소되었다. COB군에서도 투여 60분 후 가장 높은 혈당수치 (203.97,24±63.37)가 나타났으며 120분 후 glucose 투여 전과 비슷한 수치로 감소되었으며, CJ 100/200군에서도 60분 후 가장 높은 혈당치 (92.27±30.35)를 보였으며, 120분 후 glucose 투여 전 수치로 회복되었다. CJ 300/600군에서는 30분 후 최고 혈당 수치 (74.01±32.65)를 보였으며, 60분 후 투여 전 수치로 회복되었다 (Fig. 2).

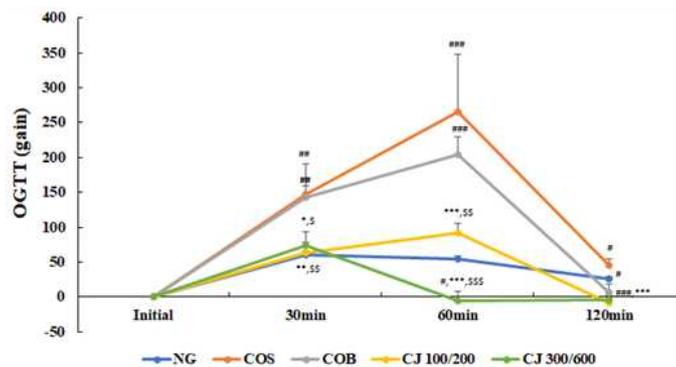


Fig. 2. Effect of CJ on OGTT in STZ-induced diabetic rats.

NG : Normal group, COS : STZ + Salin 5 ml/kg, COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/ 5 mL. Data expressed as the mean±SD (n =6). [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01, and ^{###}P < 0.001 vs. the NG group ; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01, and ^{***}P < 0.001 vs. COS group ; ^{\$}P < 0.05, ^{\$\$}P < 0.01, ^{\$\$\$}P < 0.001 vs. COB group.

6. 한약재 첨가 청국장 (CJ)의 투여가 당뇨 유발 흰쥐의 조직병리학적 변화에 미치는 영향

STZ로 유도된 당뇨모델에서 isofluran으로 흡입 마취시킨 뒤 심장에서 채혈 후 희생시켜 간, 췌장, 신장을 적출하였다. 적출한 조직들은 파라핀 절편으로 만든 후 hematoxylin & eosin stain을 시행한 결과 NG군에서는 규칙적으로 배열되어 있는 간세포의 모양을 확인 할 수 있었으나 COS군과 COB군에서는 간세포의 배열이 규칙적이지 않았다. 그러나 CJ 투여

군에서는 간세포의 배열이 규칙적으로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 신장 조직에서는 NG군에 비해서 COS군과 COB군에서 사구체 비대가 나타났으며, CJ 투여군에서는 사구체의 크기가 정상군과 비슷하게 감소 된 것을 확인하였다. 인슐린 분비에서 가장 중요한 역할을 하는 췌장에서 조직학적인 변화를 관찰한 결과, NG군에서는 랑게르한스섬이 뚜렷하고 크게 관찰되었으나, COS군과 COB군에서는 랑게르한스섬의 경계가 모호하고 정상적인 세포 소견이 관찰되지 않았다. 또한 CJ 투여군에서도 랑게르한스섬의 특징이 나타나지 않았다 (Fig. 3).

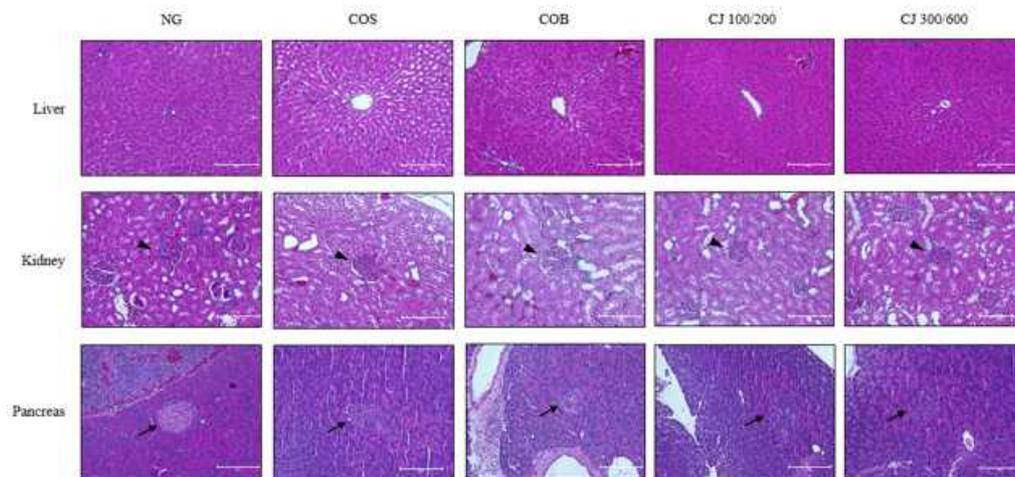


Fig. 3. Effects of CJ on the histomorphology of liver, kidney and pancreas in STZ-induced diabetic rats.

NG : Normal group, COS : STZ + saline 5 mL/kg COB : STZ + boiled bean extract 100 mg/5 mL/kg, CJ 100/200 : STZ+CJ 100/200 mg/kg/5 mL, CJ 300/600 : STZ+CJ 300/600 mg/kg/5 mL. Data expressed as the mean \pm SD (n=6), H&E stain, x200

IV. 고 찰

한국 식문화의 뿌리가 된 발효식품은 세계적으로도 건강식품으로 알려져 있다. 세균, 효모 등 미생물의 작용으로 알코올, 유기산, CO₂ 등을 생성하는 발효는 영양소의 분해를 도와 소화를 촉진하고 각종 병원균, 식중독균 등의 성장을 억제함으로써 건강증진에도 도움을 준다¹⁹⁾. 발효 식품 중 하나인 청국장은 콩을 발효해서 만드는데 발효 후 이소플라본 배당체인 daidzein, genistein 성분의 증가로 항암효과가 증진되는 것으로 알려져 있으며²⁰⁾ 또한 발효 장류인 청국장 분말이 STZ로 유도된 당뇨 쥐의 당뇨 개선에 효과가 있음이 보고되었다²¹⁾.

본 연구에서는 당뇨 치료에 효능이 있다고 알려진 국우, 맥문동, 구기자 및 산약 등의 한약재를 첨가하여 추출한 CJ가 당뇨병 증상에 미치는 영향을 알아보기 위해 CJ 추출물을 저농도 (100/200 mg/kg) 또는 고농도 (300/600 mg/kg)로 4주 동안 경구 투여한 후, 체중과 물, 사료 섭취량, 공복혈당 및 혈액 내 TC, TG 농도 변화와 당뇨 대사과 관련된 조직의 변화를 관찰하였다.

혈당을 조절하는 인슐린이 제 역할을 하지 못하게 되면 혈당을 지방으로 저장하지 못하고 소변으로 배출이 되는데²²⁾, 이때 혈당이 급격히 떨어지며 근육을 통해 에너지를 채우기 때문에 근육량이 줄어들면서 체중이 감소하게 된다²³⁾. 저용량의 STZ로 당뇨를 유발시킨 쥐의 체중이 당뇨를 유발하지 않은 쥐에 비해 유의적으로 감소했다는 것이 보고되어있다²⁴⁾. 본 연구에서도 STZ로 당뇨가 유발된 실험군에서 NG군에 비해 뚜렷한 체중감소가 나타났으며, 더불어 음수량과 사료 섭취량은 증가하는 것으로 관찰되었다. CJ를 경구 투여한 실험군에서 NG군에 비해 체중이 유의적으로 감소하였지만, COS군과 COB군에 비해 체중 감소가 줄어들었고, 사료섭취량과 음수량은 COS군과 COB군에 비해 CJ 300/600군에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. COS군과 COB군에 비해 CJ 투여한 동물의 간과 콩팥 및 췌장의 무게는 유의적으로 증가되었

으며, 근육의 무게는 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 단백질 섭취로 인한 손실 근육의 재생 및 회복기간은 최대 10주간으로 보고 있다는 연구보고²⁵⁾로 보아 근육의 회복에 관한 CJ의 영향은 4주 이상의 연구기간을 통한 추가 관찰이 필요하다고 사료된다. 공복혈당을 측정된 결과 CJ 경구 투여 2주째부터 당뇨 유발 쥐보다 CJ 경구 투여한 쥐의 혈당이 유의성 있게 감소하기 시작하였고, 3주째부터는 CJ 저농도, 고농도군 모두 공복혈당이 감소한 것을 확인하였다. 경구당부하검사 (OGTT) 결과를 보면 NG군에 비해 COS군에서 혈당 수치가 약 3배 높았고, COB군도 비슷한 수치를 보였다. CJ 추출물 경구 투여 30분 후 혈당 수치를 측정한 결과 CJ 저농도군은 NG군과 비슷한 수치를 보였고, CJ 고농도군에서는 NG군에 비해서도 낮은 혈당 수치를 나타내었다. 포도당 투여 후 NG군에서는 120분이 지나서 전과 같은 혈당 수치가 회복되었으나, CJ 투여군에서는 60분 후 전과 같은 혈당 수치로 회복되었음을 확인하였다. 이는 CJ 추출물이 혈당 강하에 효과적으로 작용할 뿐만 아니라 음식 섭취 후 나타나는 혈당의 상승을 저해한다는 것을 시사한다.

췌장 세포의 파괴를 유도하여 인위적으로 당뇨를 유발하기 위해 STZ를 투여한 동물모델에서 투여 6시간 후 베타 세포가 파괴되고, 12시간 후에는 췌장소도세포 감소가 일어나며 48시간 후에는 대부분의 베타세포 및 알파세포가 사멸되어 인슐린 분비가 저해된다고 알려져 있다²⁶⁾. 정상 췌장 조직은 알파세포와 베타세포의 조밀도가 높고 경계면이 뚜렷하지만, 당뇨병 환자의 췌장 조직은 비정상적인 당질대사로 인하여 경계가 불분명해진다²⁷⁾. 본 연구에서 당뇨를 유발하지 않은 췌장 조직에서 랑게르한스섬의 구성 형태는 잘 보존 되고 췌장 조직 또한 알파세포와 베타세포의 경계면이 뚜렷한 것을 관찰할 수 있었으며, 간 조직에서는 다각형의 간세포가 관찰되고 각 세포의 규칙적인 배열을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 STZ로 당뇨를 유발한 동물 모델 췌장의 랑게르한스섬의 경계는 불분명 했고, 간세포가 손상되어 불규칙한 배열을 보이고,

신장 조직의 사구체 또한 비대해진 것을 확인하였다 (Fig. 3). 반면, 당뇨를 유발로 인해 손상된 조직이 CJ 경구 투여 후 간 세포 배열이 회복되었고, 사구체의 비정상적인 크기 또한 NG 군과 비슷하게 작아진 것을 볼 수 있었으나, 본 연구에서는 췌장 조직의 회복을 관찰할 수 없었다 (Fig. 3). 그러나 COS 군에 비해 CJ 300/600군의 혈청 인슐린의 농도가 증가한 것으로 보아 (Table 4.) 췌장 조직의 회복도 동반할 것으로 사료된다. H&E 염색방법으로는 췌장 랑게르한스섬의 회복에 대한 영향을 관찰하는데 한계점이 있으므로 추후 IHC 분석 등 다양한 방법으로 추가 검증을 통해 혈청 인슐린의 농도가 증가한 것에 대한 근거를 마련할 필요성이 있을 것으로 생각된다.

당뇨병은 지질대사에 관련되어 HDL-C를 감소시키고, LDL-C와 중성지방을 증가시키는 것으로 보고되어 있다²⁶⁾. 본 연구에서 COS군과 COB군의 체중 변화는 없었으나, COS 군에 비해 CJ 300/600군에서는 음수량과 사료 섭취량이 감소되었고, 혈중 TG와 TC 농도와 AI 또한 감소하였다. OGTT 결과에서도 CJ 투여군에서 식후 혈당 상승 억제에 효과가 있다는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과를 통해 맥문동, 구기자, 국우, 산약 등이 함유된 CJ는 당뇨로 인한 체중 저하를 회복시키고, 조직학적인 변화 개선 및 지질 대사에 관여하여 혈당 강하에 도움을 줌으로써, 당뇨를 개선하는 효과가 있을 것으로 사료 된다.

V. 결 론

본 연구에서는 국우, 맥문동, 구기자 및 산약 등의 여러 한 약재가 첨가된 CJ의 경구 투여가 당뇨 개선에 미치는 영향을 알아보기 위해 STZ투여로 당뇨를 유발한 뒤 CJ를 경구 투여 하면서 실험을 진행하였고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중, 음수 및 식이 섭취량을 측정한 결과, 체중은 NG 군에 비해 유의적으로 감소하였고, COS군과 COB군에 비해서 CJ 100/200 및 CJ 300/600 군에서 체중감소가 낮았다. 음수 및 식이 섭취량은 COB군에 비해 CJ 300/600군에서 감소하는 경향이 나타났다.
2. 공복혈당을 측정한 결과, COS군에 비해 COB군 및 CJ 100/200, CJ 300/600군에서 공복혈당이 감소하는 경향을 보였으며 4주 후 당뇨 유발군에 비해 혈당 수치가 모두 농도 의존적으로 감소하였고 통계적 유의성도 나타났다.
3. OGTT 결과, COS군과 COB군에서는 식후 60분에 최고 혈당치를 나타냈으며, 120분 후에 투여 전 혈당 수치로 회복되었고 CJ 100/200군, CJ 300/600군에서는 COS 군에 비해 낮은 식후 혈당수치를 보였다. 특히 CJ 300/600군에서는 식후 30분에 최고 혈당수치를 보이다가 60분에 투여 전 혈당치로 회복된 것을 확인하였다.
4. 혈청 지질 성분 및 AI 측정 결과, TG와 TC는 CJ 300/600 군에서 COS군에 비해 유의하게 감소하였으며, HDL-C는 COS군에 비해 CJ 100/200군, CJ 300/600군에서 증가한 경향이 나타났다. LDL-C는 CJ 100/200군, CJ 300/600군에서 COS군에 비해 유의하게 감소하였다.
5. 조직학적인 변화를 관찰한 결과, CJ 투여로 당뇨 유발로 손상된 췌장 랑게르한스섬의 회복은 관찰되지 않았으나, 간세포의 다각형 모양이 회복되고 세포 간의 배열 또한 규칙적인 양상을 보였으며, 당뇨 유발로 비대해졌던 신장 사구체의 크기가 회복되었다.

따라서, 본 연구에서 맥문동, 구기자, 산약, 황정, 국우, 영지버섯과 표고버섯이 함유된 CJ추출물은 STZ로 유발된 당뇨 모델 동물의 저하된 체중을 회복시키고, 조직학적인 변화 개선 및 지질 프로파일의 정상화와 혈당을 감소시킴으로써, 당뇨병의 치료에 도움을 주므로 식이요법뿐 아니라 치료 소재 개발 등에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 ; 37 : 1 595-607.
2. Barrett-Connor E. Epidemiology, obesity, and NIDDM. *Epidemiol Rev*. 1989 ; 11 : 1772-181.
3. Schiekofe S, Balletshofer B, Andrassy M, Bierhaus A, Nawroth PP. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost*. 2000 ; 26 : 503-11.
4. Kim YY, Choue RW, Chung SH, Koo SJ. Anti-hyperglycemic effect of Cortex Mori radices in db/db mice. *Korean J Food Sci Technol*. 1999 ; 31 : 1057-64.
5. Bailey CJ. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem Parmacol*. 1999 ; 58 : 1511-20.
6. Kang SA, Jang KH, Cho YH. Effects of artificial stomach fluid and digestive enzymes on the aglycone isoflavone contents of soybean and black Bean. *Korean J Nutr Soc*. 2003 ; 36(1) : 32-9.
7. Kwon DY, Jang JS, Lee JE, Shin DH. The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity in vitro. *BioFactors*. 2006 ; 26,4 : 245-58.
8. Bhatena S, Velasquez M. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2002 ; 76(6) : 1191-201.
9. Kim CG, Kim SI, Shin HK. Effect of fructooligosaccharide-inulin of Jerusalem artichoke on the growth of intestinal microorganisms of pig. *Kor J Food Sci Technol*. 1993 ; 25 : 395-9.

10. Baltacioglu C, Esin A. Chips production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L). *Food Nutr Sci*, 2012 ; 3 : 1320-28.
11. Shibata M, Noguchi R, Suzuki M, Iwase H, Soeda K, Niwayama K, Kataoke E, Hamano M. Pharmacological studies on medicinal plant components. I. On the extracts of *Ophiopogon* and some folk medicine. *Proc Hoshi Pharm*, 1971 ; 13 : 66-76
12. Chung HK, Choi CS, Yang EJ, Kang MH. The effect of *Lycii fructus* beer intake on serum lipid profiles and antioxidant activity in rat. *Kor J Food Culture*, 2004 ; 19 : 52-60.
13. Hikino H, Konno C, Takahashi M, Murakami M, Kato Y, Karikura M, Hayashi T. Isolation and hypoglycemic activity of dioscorans A, B, C, D, E and F : glycans of *Dioscorea aponica* rhizophors. *Planta Med*, 1986 ; 52 : 168 - 71.
14. Chobanian AV, Hill M. National heart, lung and blood institute workshop on sodium and blood pressure. A critical review of current scientific evidence. 2000 ; 35 : 858-63.
15. Bond JS, Failla ML, Unger DF. Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *JBC*, 1985 ; 258 : 8004-9.
16. Kim HW, Ha TH, Cho MR, Cho SI. Effects of herbal remedy for diabetes mellitus-01(HRDM-01) on liver and serum lipid level in diabetic rats. *Kor J Herbol*, 2010 ; 25(3) : 117-21.
17. Oh, TW, Park YK. Effect of the *lycii fructus* on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbol*, 2015 ; 30(6) : 47-53
18. M, Titford, "The long history of hematoxylin", *Biotech Histichem*, 2005 ; 2 ; 73-8.
19. Park KY, Rhee SH. Functional foods from fermented vegetable products : Kimchi (Korean fermented vegetables) and functionality. *Nutrafoods*, 2005 ; 13, 341-80.
20. Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, diadzein and their beta-glycoside conjugates : antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem*, 1993 ; 41 : 1961.
21. Friedbwald J, Ruhrah J. The use of the soybean as a food in diabetics. *Am J Med Sci*, 1990 ; 14 : 793-9.
22. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk : Is albumin excretion rate sufficient. *Diabetes*, 2000 ; 49 : 1399-1408.
23. Oh TW, Kang SY, Park YK. Histological analysis of five organs in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbol*, 2013 ; 28(6) : 39-45.
24. Kurt J, Isselbacher KJ, Braunwald E, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Harrison TR. Principles of Internal Medicine, Diabetes Mellitus. 1997 ; 13,6 : 339-46.
25. P Cribb, J Williams, AD Carey, MF Hayes. "The effect of whey isolate and resistance training on strength, body composition, and plasma glutamine". *Int J Sport Psychol*, 2006 ; 16(5) : 494-509.
26. Park IS, Che YZ, Bendayan M, Kang SW, Min BH. Up-regulation of clusterin (sulfated glycoprotein-2) in pancreatic islet cells upon streptozotocin injection to rats. *J Endocrinol*, 1999 ; 162 : 57-65.
27. Lee SI. Studies on the diuretic action of oryeongsan and kami-oryeongsan, 1981 ; 12 : 67-8.
28. Sa KK, Son SY, Kim IS, Jung YH, Han YH, Ahn SY. Effects of gamioryeongsan, gamiyukmijihwangtang and vinegar on rats with acute renal failure induced by gentamicin sulfate. *Kor J Kyung Hee University* 1991 ; 7 : 287-311.