

## *In vivo*와 *in vitro*에서 상지 및 상백피 에탄올추출물이 식후 혈당 상승 억제 조절에 미치는 영향\*

박수연<sup>1\*\*</sup> · 진보라<sup>1\*\*</sup> · 이유림<sup>1</sup> · 김유진<sup>1</sup> · 박정빈<sup>2</sup> · 전영희<sup>3</sup> · 최상원<sup>3</sup> · 권오란<sup>1†</sup>

이화여자대학교 식품영양학과,<sup>1</sup> 이주대학교 응용화학생명공학과,<sup>2</sup> 대구가톨릭대학교 식품영양학과<sup>3</sup>

## Postprandial hypoglycemic effects of mulberry twig and root bark *in vivo* and *in vitro*

Park, Soo Yeon<sup>1\*\*</sup> · Jin, Bo Ra<sup>1\*\*</sup> · Lee, Yu Rim<sup>1</sup> · Kim, You Jin<sup>1</sup> · Park, Jeong Bin<sup>2</sup> · Jeon, Young Hee<sup>3</sup> · Choi, Sang Won<sup>3</sup> · Kwon, Oran<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

<sup>2</sup>Department of Applied Chemistry and Biological Engineering, Ajou University, Suwon 16499, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyung-san 38430, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** Our previous study demonstrated the hypoglycemic effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaf and the underlying mechanisms. Here we explored the potency of mulberry twigs (TW) and root barks (RB) in postprandial hypoglycemic effects *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The major components of TW and RB were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Alpha-glucosidase inhibition and glucose/fructose uptake inhibition in Caco-2 cells were determined for TW, RB, and their major components, followed by an oral sugar tolerance test (OSTT) in streptozotocin-induced diabetic rats. Male Wistar rats were fed a high-fat diet for 2 weeks and then a single dose of streptozotocin (35 mg/kg B.W) was administered by intraperitoneal injection. Rats with fasting blood glucose levels above 126 mg/dL were randomly divided into 5 groups (n = 8/group) for the following treatments by gavage for 4 weeks: vehicle (normal control and diabetic control), 200 mg/kg B.W of TW or RB or 100 mg/kg B.W of oxyresveratrol (OXY). **Results:** OXY and mulberroside A were identified as the major components of TW and OXY, mongolicin, and kuwanon H for RB. A significant inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase was found for TW, RB, and OXY (p = 0.0099). There was a dose-dependent inhibition of TW and RB on the intestinal sugar uptakes in Caco-2 cells, showing a greater impact on fructose compared to glucose. The OSTT showed that TW and RB significantly delayed time to maximal concentration (p = 0.0088) and decreased maximal concentration (p = 0.0043) compared to the control group. **Conclusion:** These results suggest that TW and RB may have a postprandial hypoglycemic effect, particularly in the case of high fructose or sucrose intake. OXY was suggested as a contributor to the hypoglycemic effect of TW and RB. Further studies are needed for the systemic effect of TW and RB in circulation.

**KEY WORDS:** mulberry, postprandial hypoglycemic effect,  $\alpha$ -glucosidase inhibition, Caco-2 cells

### 서 론

당뇨병은 대표적인 만성 대사성 질환으로 인슐린 저항성과 혈중 인슐린 농도가 변화되어 혈중 포도당 농도가 높아지는 것을 특징으로 하는 질환이다.<sup>1</sup> 고혈당이 지속되면

지질 및 단백질 대사에 이상을 초래하여 신장 기능의 저하, 동맥경화, 망막 출혈로 인한 시력 저하, 족부 궤양, 말초신경병증 등 다양한 합병증을 유발한다.<sup>2</sup> 대한당뇨병학회와 건강보험 심사평가원에서 실시한 한국인 당뇨 역학조사 결과에 따르면 당뇨병 환자는 2005년 이미 한국인 전체 인

Received: November 6, 2015 / Revised: December 11, 2015 / Accepted: January 22, 2016

\*This study was performed with the support of the RIS program funded by the Ministry of Trade, Industry and Energy, Republic of Korea (R0002111).

\*\*These two authors contributed to this work equally.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-3277-6860, e-mail: orank@ewha.ac.kr

© 2016 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.

구의 7.7%를 차지하고 있어 건강보험 총 진료비의 1/5에 해당하는 비용이 당뇨병 환자의 진료비로 지출되는 등 막대한 사회적 손실이 발생되고 있다.<sup>1</sup> 더욱이 당뇨병의 이환율은 계속 증가될 것으로 추정되므로 특별한 예방조치가 없으면 2020년에는 8.97%, 2030년에는 10.85%까지 도달할 전망이다.<sup>3</sup> 당뇨병은 수반되는 합병증의 발병률이 높다는 특성을 가지고 있으며, 당뇨병 치료를 위해 약물을 장기간 복용할 때 부작용이 우려되고 있다.<sup>4</sup> 따라서 최근에는 부작용이 없는 기능성식품을 이용하여 과도한 당의 흡수를 억제하고 당뇨병을 예방하는 노력이 시도되고 있다.<sup>5</sup>

예로부터 뽕나무는 열매, 잎, 가지 및 뿌리껍질에 이르기까지 각기, 부종, 당뇨, 기침 및 가래 등의 치료에 널리 이용되어 왔다.<sup>6</sup> 최근에는 정밀한 성분분석이 가능해 짐에 따라 고부가가치 식품소재로 뽕나무의 가치가 과학적으로 재조명되기 시작하였다. 부위별로는 뽕나무 잎(상엽)에 대한 연구가 가장 많이 수행되어, 대표적인 혈당강화성분인 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)과 그밖에 rutin, quercetin, isoquercitrin과 같은 플라보노이드의 성분이 확인되면서 혈당저하기능을 중심으로 만성 대사성 질환과 관련된 고부가가치 식·의약 소재로 크게 각광받고 있다.<sup>7-9</sup> 본 연구팀은 이전 연구에서 상엽은  $\alpha$ -glucosidase 활성을 저하시키고 소장에서 당류의 흡수를 저하시키는 작용기전을 통해 식후혈당 상승을 억제하는 효과가 있음을 시험관, 동물, 인체연구를 통해 발표한 바 있다.<sup>9-15</sup> 최근에는 잎 뿐만 아니라 가지(상지)와 뿌리껍질(상백피)에서도 다양한 활성 성분이 분리되고 있으며, 그 효과가 보고되기 시작하였다. 상지의 기능성으로는 항암, 면역조절,<sup>16,17</sup> 항고혈압<sup>18</sup> 및 항염증<sup>17</sup>이 보고되고 있으며, 상백피의 기능성으로는 미백과 항산화<sup>19</sup> 그리고 혈당저하와 간보호<sup>20</sup>가 보고된 바 있다. 그러나 상엽의 연구에 비해 상지 및 상백피에 대해서는 식후혈당조절 기능과 작용기전 연구가 활발히 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구는 상엽과 마찬가지로 상지와 상백피도 소장에서 당의 흡수를 억제하는데 유효할 것이라 가정하였다. 이를 증명하기 위해 high performance liquid chromatography (HPLC)를 사용해 상지와 상백피의 주요 성분을 분석하고, *in vitro* 시스템에서 상지, 상백피 및 주요성분의  $\alpha$ -glucosidase에 의한 이당류 분해 억제능과 소장세포에서 당 흡수 억제능을 측정하였다. 아울러 *in vitro* 시험 결과의 생리적 적용성을 검토하기 위해 스트렙토미신(streptozotocin, STZ)으로 고혈당을 유도한 모델동물을 사용하여 상지 및 상백피의 식후혈당조절기능을 검증하였다.

## 연구방법

### 시험물질의 제조

본 연구에 사용된 시험물질은 상지 에탄올추출물 (TW) 및 상백피 에탄올추출물 (RB)이다. TW와 RB의 제조방법은 이전 연구에서 보고한 바 있다.<sup>21</sup> 간략히 설명하면, TW는 상지 (2.0 kg)에 60% 에탄올수용액 (10 L)을 넣고 초음파추출기 (Power Sonic 420, Hwashin, Korea)를 사용하여 2시간씩 2회 반복 추출 및 여과 (Whatman No. 2 filter paper, Whatman International Ltd., England)하고 감압농축기 (Rotary evaporator, EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하여 얻었다. RB는 상백피 (500 g)에 80% (2 L) 및 95% 에탄올수용액 (2 L)를 차례로 넣고 초음파추출기를 사용하여 2시간씩 2회 반복하여 추출, 여과 및 감압농축하여 얻었다. TW 및 RB의 주요성분인 oxyresveratrol (OXY), mongolicin, 그리고 kuwanon H는 Diaion HP-20 칼럼 (16 cm × 100 cm), 실리카겔 (70-230 mesh) 칼럼 (4.6 cm 또는 2.8 cm × 60 cm), ODS-A 칼럼 (3 cm × 30 cm) 및 Sephadex LH-20 칼럼 (2.5 cm × 50 cm)을 순차적으로 사용하여 분리 및 정제하여 획득하였다.

### TW 및 RB의 주요 성분 분석

TW 및 RB의 주요 성분은 HPLC (Waters e2695 HPLC System, Milford, MA, USA)로 분석하였다. 시료는 80% 에탄올용액에 녹인 후 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거시킨 상등액을 취하고, 감압농축 후 다시 같은 용액으로 2배 희석시켜 여과막 (0.45  $\mu$ m, 13 mm, Pall-Gelman Lab, Ann Arbor, MI, USA)을 통과시킨 후 HPLC에 주입하여 정량분석하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 칼럼은 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> column (5  $\mu$ m, 46 × 250 mm, YMC Inc., Wilmington, NC, USA)을 사용하였다. 이동상은 TW와 RB의 조건을 달리하여 분석하였다. TW의 경우에는 유속 0.8 mL/min에서 용매A (0.05% 인산수용액) 100%로부터 용매B (아세트니트릴) 100%까지 60분간 구배용출시켰다. RB의 경우에는 유속 1 mL/min에서 용매 A (0.02% 포름산수용액) 100%로부터 용매 B (아세트니트릴) 100%까지 70분간 점진적으로 변화시켰다. 주입량은 10  $\mu$ L, 그리고 검출기는 UV<sub>320 nm</sub>로 고정하여 사용하였다. HPLC로 분리된 각 물질의 피이크는 보유된 표준물질을 이용하여 정량분석 하였다. 앞서 상백피 및 상지로부터 분리된 각 화합물의 화학구조 동정은 NMR 분석과 이미 보고된 각 화합물의 NMR 및 MS data 비교분석을 통해 각각 동정하였다.<sup>22,23</sup>

### Alpha-glucosidase 활성 억제능 측정

Alpha-glucosidase 효소원으로 흰쥐 소장 유래의 아세톤 추출 파우더 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, 기질로 말토오스와 수크로오스를 사용하여 TW 및 RB의  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 측정하였다. 아세톤 추출 파우더 1 g을 0.9% 염화나트륨 용액 10 mL에 녹인 후 초음파 처리하고 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 분석에 사용하였다. 100 mM 말레산염 용액 (pH 6.0, 700  $\mu$ L)과 500 mM 말토오스 혹은 수크로오스 (100  $\mu$ L), 그리고 측정시료 (100  $\mu$ L)를 혼합하여 37°C에서 5분간 정치시켰다. 이에  $\alpha$ -glucosidase 용액을 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 말레산염-트리스-수산화나트륨 (pH 7.4, 1 mL)을 넣어 반응을 종료시켰다. 생성된 글루코스는 측정용 키트 (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)로 분석하여  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 측정하였다.

### 세포배양

인체 대장상피세포주인 Caco-2세포 (ATCC HTW-37, Manassas, VA, USA)는 20% 우태아혈청 (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids (NEAA), 1% penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)을 사용하여 배양하였다. 배지는 3~4일에 한번씩 교체하였으며, 세포배양은 5% CO<sub>2</sub> 가스가 존재하는 37°C 배양기 (Sanyo MCO-18AC, Sanyo, Japan)에서 진행되었다.

### 세포 생존율 평가

TW 및 RB에 대한 Caco-2 세포의 생존율 평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 방법으로 분석하였다.<sup>24</sup> 세포를  $1 \times 10^5$  cells/mL 수준으로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, TW 및 RB를 배지에 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양하였다. 이어서 MTT시약 (5 mg/mL)을 넣고 150 rpm 5분간 교반 후, CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. 마지막으로 배양용액을 제거하고 DMSO로 씻은 후 micro-plate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 측정된 흡광도는 살아 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소 작용에 의해 MTT가 formazan으로 환원된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례한다. TW 및 RB로 전처리한 세포의 생존율은 아래 공식에 따라 생존하는 시료 무첨가군의 생존율의 평균값에 대한 상대적인 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

### Cell viability (%)

$$= \frac{(\text{O.D. value of treated well} - \text{O.D. value of the blank})}{(\text{O.D. value of untreated well} - \text{O.D. value of the blank})} \times 100\%$$

### 포도당 및 과당 흡수 억제능 측정

TW 및 RB의 포도당 및 과당 흡수 저해능을 측정하기 위하여 Caco-2 세포를  $1.5 \times 10^4$  cells/mL 수준으로 12 well plate에 분주하고 7일간 배양하였다. 세포는 PBS로 2번 세척 후, 5 mM 글루코스 크랩스 용액 (5 mM glucose, 30 mM HEPES, 130 mM NaCl, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)을 한 well에 0.3 mL씩 넣고, 37°C에서 30분간 정치시켰다. 이어서 PBS로 세척한 세포에 포도당이 없는 크랩스 용액을 넣고, [<sup>3</sup>H] 2-deoxyglucose 혹은 [<sup>14</sup>C] fructose가 포함된 포도당 혹은 과당용액과 시험물질을 첨가한 후 상온에서 5분간 정치 후, 차가운 PBS로 3회 세척하고, CHAPS 용액으로 세포를 용해시켜 liquid scintillation counter (LS6500, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 동위원소를 측정하였다. 단위시간당 세포의 포도당 및 과당 흡수능은 단백질 양으로 보정하였다.

### 실험동물 사육 및 당뇨유발

실험동물은 6주령 Wistar계 수컷 흰 쥐 (약 200 g)이며 오리엔트사 (Daejeon, Korea)로부터 공급받았다. 일주일간 물과 표준식이 (5L79 Purina rat chow, Charles River Lab., Wilmington, MA, USA)를 자유롭게 공급하며 사육실 환경에 적응시켰다. 실험동물 사육실 환경온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도는  $55 \pm 5\%$ , 명암은 12시간 주기 (06:00~18:00)로 자동 유지하였다. 적응기간 후 2주간 열량의 60% 고지방식이 (D12492 Rodent Diet with 60 kcal% fat; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 공급하였으며, 실험동물의 당뇨유발을 위해 STZ를 0.1 M 시트르산 완충용액 (pH 4.5)에 용해시켜서 30 mg/kg B.W.의 수준으로 복강 내에 1회 주사하였다. 당뇨유발은 STZ 투여 72시간 후 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당측정기 (Accu-Chek, Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 확인하였으며, 공복혈당이 126 mg/dL 이상이면 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 난괴법으로 8마리씩 5군으로 분류하였다. 정상대조군 (CON), 당뇨대조군 (DB CON)에는 증류수를 투여하였고, TW추출물군 (TW 200 mg/kg B.W., TW), RB추출물군 (RB 200 mg/kg B.W., RB), OXY군 (OXY 100 mg/kg B.W., OXY)에는 각 시험물질을 28일간 경구투여를 실시하였으며, 열량의 60% 고지방식이 (D12492 Rodent Diet

with 60 kcal% fat)를 함께 공급하였다. 본 동물 실험 프로토콜은 이화여자대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No. 20 14-058).

### 경구 당부하도 측정

실험동물을 12시간 이상 절식시킨 후 시험물질의 경구투여를 시작한 첫날 (1일차)과 마지막 날 (28일차)에는 시험물질 섭취 직후 2 g/kg B.W.의 수크로오스를 경구투여하고, 0, 15, 30, 60, 90, 120분에 꼬리정맥을 채혈하여 혈당측정기를 이용하여 혈당을 측정하였다. 각 측정 시간대 별 혈당량의 변화를 혈당반응곡선으로 나타내고, 공복혈당에 대한 시료섭취 후 혈당곡선하면적 (area under the curve, AUC), 최고혈중농도 (C max) 및 최고혈중농도 도달시간 (T max)을 산출하여 비교 하였다.

### 통계분석

모든 실험 결과는 Statistical Analysis Systems package version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 분석

하였으며, 평균  $\pm$  표준오차 (SE)로 나타내었다.  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능과 포도당 및 과당 흡수 저해능은 시료를 첨가하지 않은 대조구를 100%로 간주하여 백분율로 나타내었다. 효소의 활성 및 흡수를 50% 저해하는데 필요한 농도인 IC<sub>50</sub> 값의 계산은 4-parameter logistic curve를 이용하였으며, SigmaPlot version 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) 프로그램을 사용하여 계산 하였다. 시험군간 분석 항목별 차이는 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)를 수행한 후, Duncan's multiple range test를 수행하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다. 정상 대조군과 당뇨 대조군 두 군간 분석은 Student's t-test를 수행하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 상지 및 상백피의 주요 성분 함량

TW와 RB에 대한 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. TW의 mulberroside A는 12분대, OXY는 31분대, 그리고

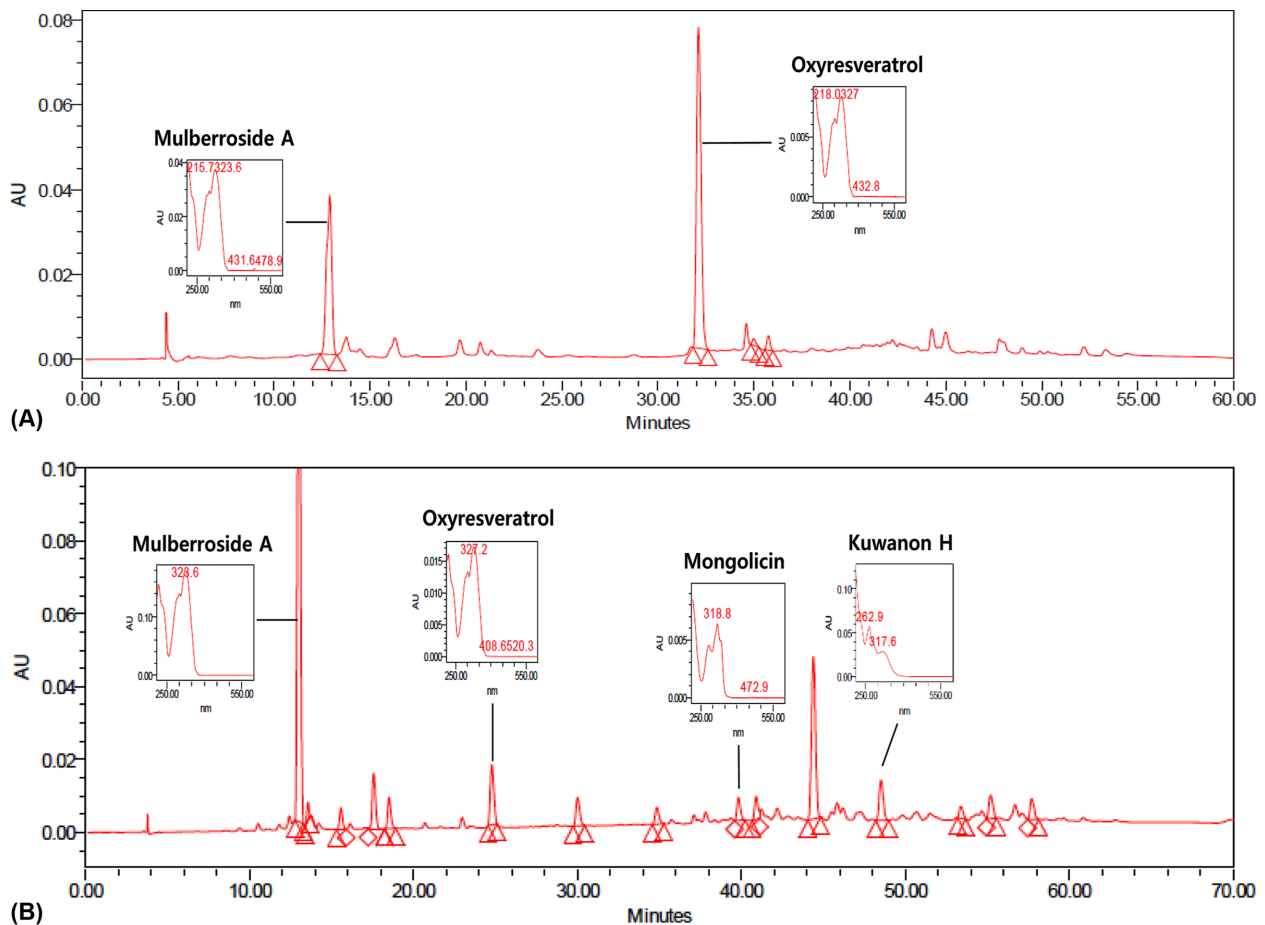


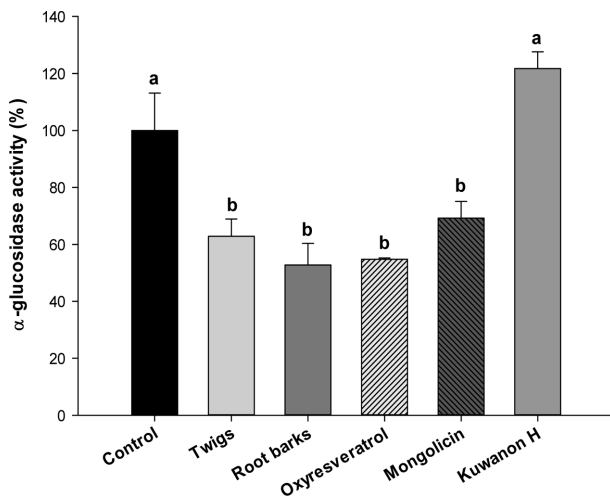
Fig. 1. HPLC chromatograms of mulberry twigs (A) and root barks (B). Analytical conditions are described in the method section.

RB의 OXY는 24.9분대에 mongolicin은 44.4분대, kuwanon H은 48.7분대에 피크가 나타났으며 양호하게 분리되었다. TW의 경우에는 OXY와 그 배당체인 mulberroside A가 각각 3.89%, 5.50% 수준으로 유사한 함량을 나타냈으나, RB의 경우에는 그 함량이 0.36%, 15.74%로 배당체의 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 또한 TW와 달리 RB의 성분으로 mongolicin과 kuwanon H도 검출되었다.

### Alpha-glucosidase 활성 억제

Alpha-glucosidase는  $\alpha$ -amylase에 의해 분해된 이당류를 최종적으로 단당류로 전환시킨다. 빵안에 함유된 1-DNJ

는 대표적인  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 알려져 있다.<sup>25</sup> TW, RB와 세 가지 주요 성분 (OXY, mongolicin 및 kuwanon H)의  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제 실험결과는 Fig. 2와 Fig. 3과 같다. 말토오스를 기질로 하여 400  $\mu$ g/mL의 농도에서 시료의  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 비교한 결과 OXY와 mongolicin가 유의적인  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 나타냈으나, TW 및 RB와 유사한 억제능은 OXY에서만 관찰되었다 (Fig. 2). 기질을 말토오스와 수크로오스로 달리하고 25~400  $\mu$ g/mL의 농도에서 시료의  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제능을 비교하였을 때, 세 가지 시험물질에서 모두 말토오스보다 수크로오스에 대해 강한 활성 억제능을 나타냈다.



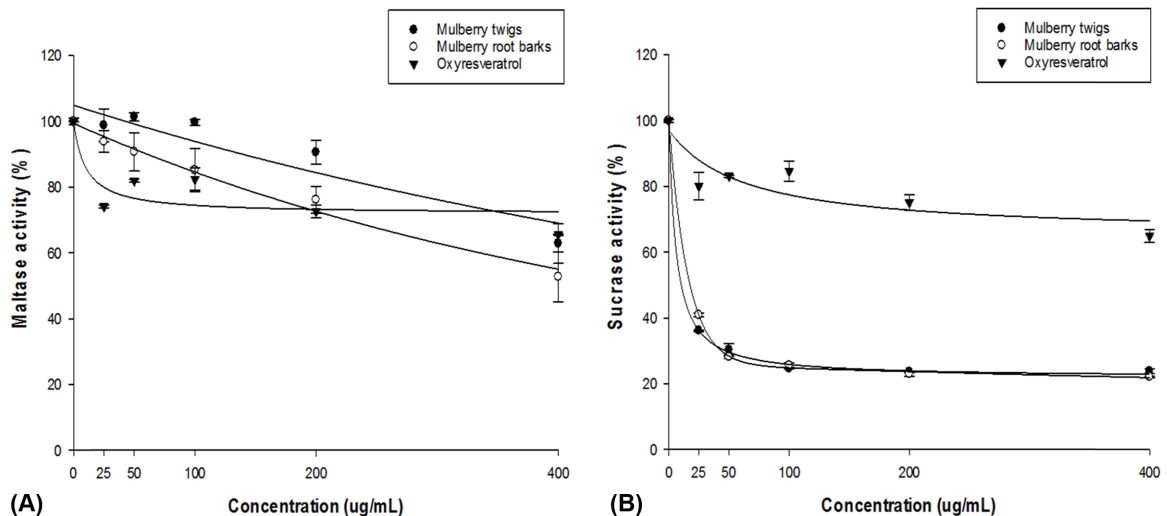
**Fig. 2.** Inhibitory effects of mulberry twigs, root barks, and their major components on  $\alpha$ -glucosidase activity. Values are mean  $\pm$  SE. Different letters indicate significant differences at the  $p < 0.05$  level using Duncan's multiple range test.

### 세포 생존율에 미치는 영향

세포실험에 앞서 TW, RB의 세포 독성을 평가하기 위해 Caco-2 세포에서 MTT시험을 수행하였다. 그 결과, TW ( $p = 0.0005$ )와 RB ( $p < .0001$ ) 모두 최고농도인 1,000  $\mu$ g/mL에서는 세포 생존율이 50% 이하로 유의하게 감소하였으므로 모든 실험은 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 500  $\mu$ g/mL 이하에서 수행되었다 (Fig. 4).

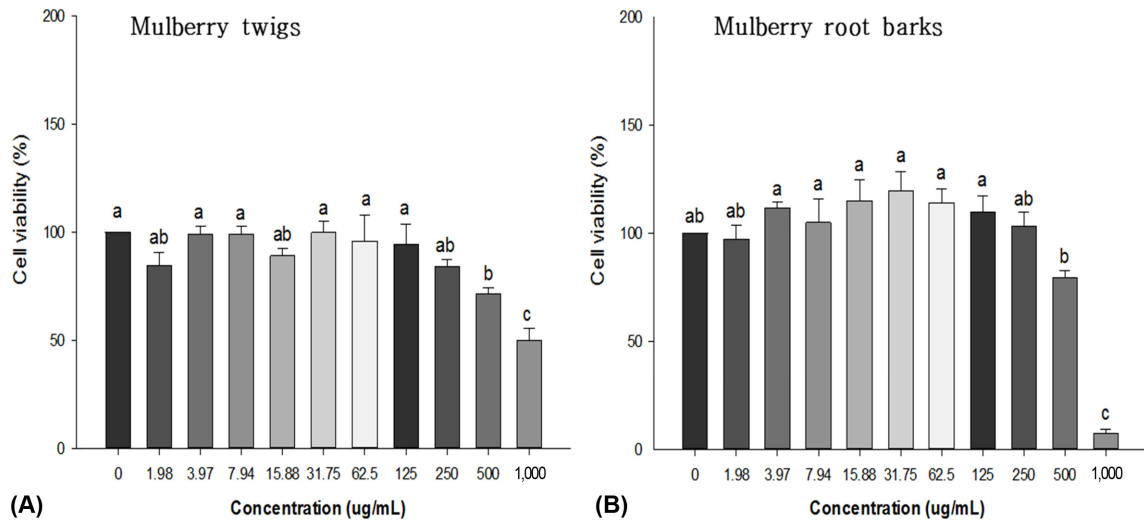
### 포도당 및 과당 흡수 억제

TW와 RB의 농도를 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL로 증가하며 Caco-2 세포의 포도당 및 과당 흡수 억제능을 평가한 결과, TW와 RB는 농도의존적으로 당류의 흡수를 억제하는 것으로 나타났다. 특별히 포도당에 비해 과당에 대한 흡수 억제능이 뚜렷하게 높은 것으로 나타났다 (Fig. 5). 과당에 대한  $IC_{50}$ 값은 TW의 경우 89.74  $\mu$ g/mL이었으며, RB의 경우 81.02  $\mu$ g/mL로 산출되었다. 포도당에 대한

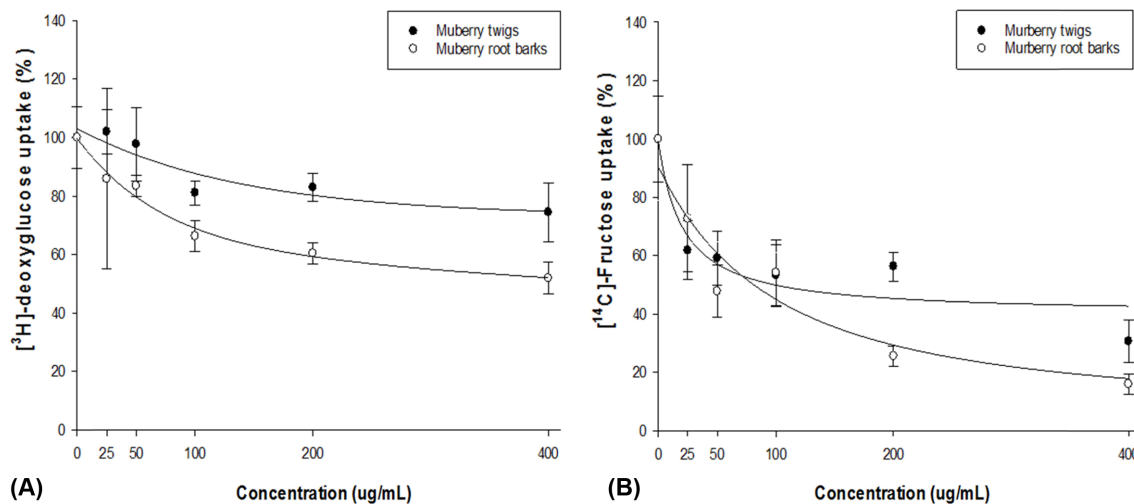


**Fig. 3.** Inhibitory effects of mulberry twigs, root barks, and oxyresveratrol on  $\alpha$ -glucosidase activity with maltose (A) and sucrose (B) as substrates. Values are mean  $\pm$  SE.





**Fig. 4.** The effects of mulberry twigs (A) and root barks (B) on cell viability of Caco-2 cells. Cells were incubated with mulberry twigs or root barks at different concentrations ranging from 0 to 1,000  $\mu\text{g/mL}$  for 1 hr. Data was normalized to that of the vehicle. Values are mean  $\pm$  SE. Different letters indicate significant differences at the  $p < 0.05$  level using Duncan's multiple range test.



**Fig. 5.** Inhibitory effects of mulberry twigs and mulberry root barks on sugar uptake in Caco-2 cells: glucose (A) and fructose (B). Caco-2 cells were grown on 24-well plates and incubated in 10 mM Krebs' buffer containing  $[^3\text{H}]$ -2-deoxyglucose or  $[^{14}\text{C}]$ -fructose for 5 min at  $37^\circ\text{C}$ . Inhibition of  $[^3\text{H}]$ -2-deoxyglucose uptake or  $[^{14}\text{C}]$ -fructose uptake was measured at the increasing concentrations of mulberry twigs (●), mulberry root barks (○), by quantitation of radioactivity using scintillation counter. Values represent mean  $\pm$  SE.

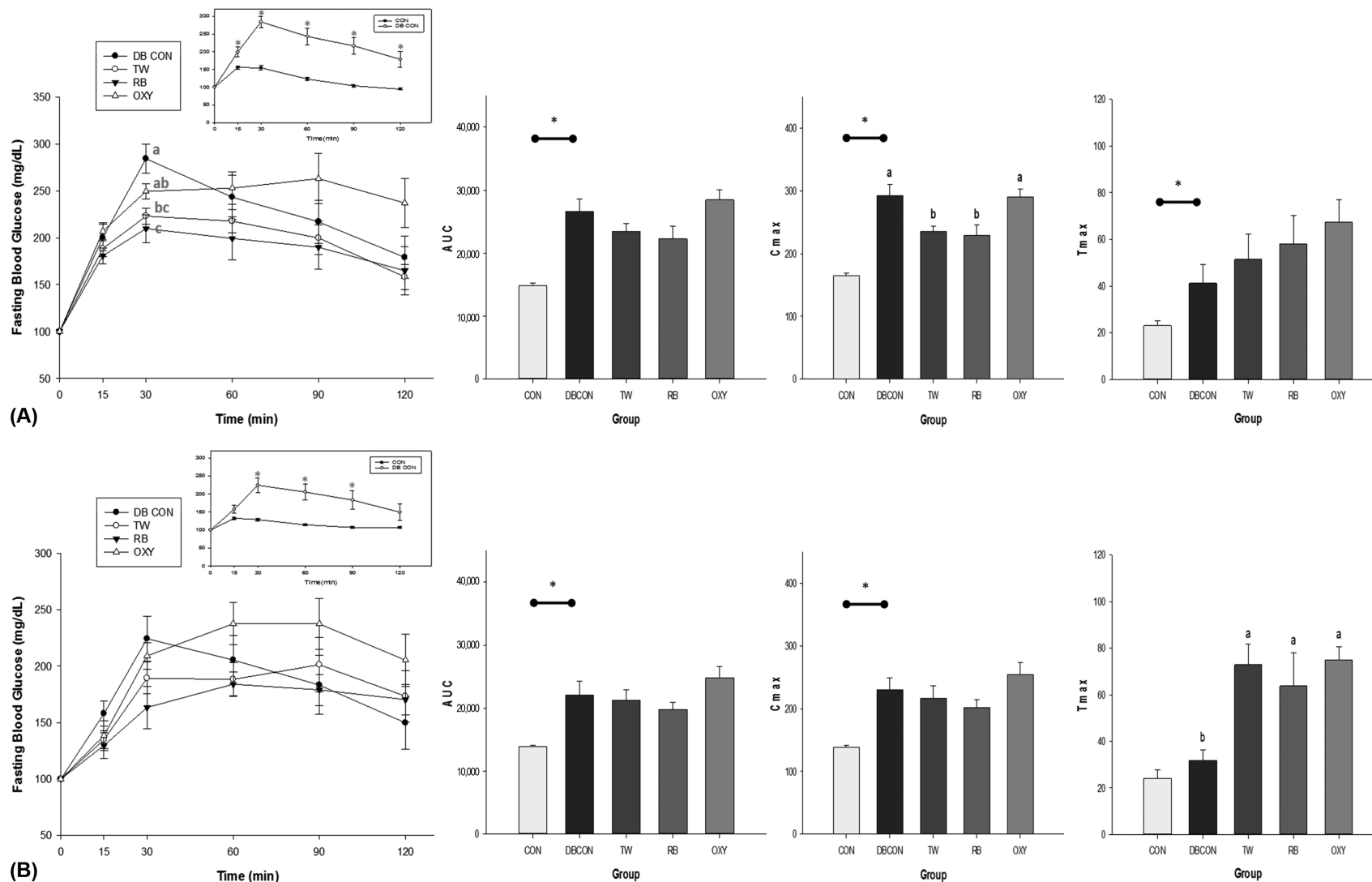
$\text{IC}_{50}$ 값은 TW의 경우 832.55  $\mu\text{g/mL}$ 이었으며 RB의 경우 479.92  $\mu\text{g/mL}$  였다. Alpha-glucosidase 활성 억제제를 나타낸 OXY는 TW와 유사한 수준으로 포도당 흡수 억제에 대해 유의적인 효과를 보였다 (데이터 제시하지 않음).

### 경구당부하 감소 효능

STZ로 처리한 실험동물에 TW, RB와 OXY를 단회 투여 또는 28일간 지속적으로 경구 투여한 다음, 수크로오스 부하 내성시험을 수행한 결과는 Fig. 6에 제시하였다. STZ 처리군은 정상대조군에 비교하여 모든 시간대에서 혈당

수준이 높게 관찰되었다 ( $p < 0.05$ ). 각 측정시간 중 30분 후 혈당은 TW 섭취군  $222.93 \pm 8.49 \text{ mg/dL}$ , RB 섭취군  $209.79 \pm 14.73 \text{ mg/dL}$ 로 측정되어 당뇨대조군에 비해 추출물군에서 유의적으로 감소하였다 ( $p = 0.0011$ ). 최고혈중농도 (C max)는 당뇨대조군과 비교하였을 때, TW와 RB 섭취군에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $p = 0.0043$ , Fig. 6A).

한편 TW와 RB를 28일 간 경구투여 후 수크로오스 부하 내성시험을 수행한 결과, 최고혈중농도 도달시간 (T max)이 당뇨대조군과 비교하여 TW와 RB, OXY 투여군 모두



**Fig. 6.** Effects of mulberry extracts on postprandial blood glucose responses (AUC levels, C max, T max) in streptozotocin-induced Diabetic Wistar rats (A) Day 0 or (B) Day 28. The inset graph is comparison of fasting blood glucose level between CON and DB CON. The animals received orally administered sucrose (2 g/kg B.W.) with mulberry twigs, root barks extract and OXY after overnight fasting for 12 h. Blood glucose levels were determined from tail blood samples at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min. CON, normal control (n = 13); DB CON, Diabetes control (n = 8); TW, Mulberry twigs extract 200 mg/kg B.W. (n = 7); RB, Mulberry root barks extract 200 mg/kg B.W. (n = 8); OXY, Oxyresveratrol 100mg/kg B.W. (n = 8); Values represent mean  $\pm$  SE. Different letters indicate significant differences at the  $p < 0.05$  level using repeated measure analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* Duncan's multiple comparison tests. Asterisks in the inset graph denote significant differences relative to control group ( $p < 0.05$  by Student's *t*-test).

유의적으로 길게 나타났다 ( $p = 0.0088$ , Fig. 6B).

## 고 찰

상지, 상백피, 상엽은 뽕나무에서 기원한 약재로서 한의 학계에서 오랜 시간 동안 사용되어 왔다.<sup>26</sup> 이에 이들의 다양한 생리활성성분과 기능에 관한 연구가 이루어져 왔으며, 특히 상엽의 기능성분인 1-DNJ와 식후혈당 조절 기능에 대해 이전 연구에서 진행되어진 반면 상지 및 상백피의 식후혈당조절 기능과 작용기전에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 상지 및 상백피의 생리활성물질을 분리 및 정제 하였으며, Caco-2 세포와 STZ로 당뇨를 유도한 실험동물에서 상지·상백피 추출물과 주요성분의 식후혈당 조절 효과를 실험하는 것을 목적으로 수행되었다.

제2형 당뇨병환자에서 식후 혈당이 급격히 증가하고, 고혈당이 지속되면 다양한 합병증이 유발된다.<sup>2</sup> 당뇨를 조절하는 주요 인자로 크게 두 가지를 이야기하는데 하나는 인슐린 분비를 통한 혈당 조절이며, 다른 하나는 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당의 급격한 증가를 억제시키는 것이다.<sup>27,28</sup> 본 연구에서는 후자에 초점을 맞추어 진행되었으며, 이는 공복혈당과 식후혈당 수준을 조절하는 것이 당뇨의 조절에 중요한 인자이며, 특히 공복혈당보다는 식후혈당 수준을 조절하는 것이 혈당 조절에 유의미하기 때문이다.<sup>29</sup> 소장 상피세포 점막에 위치하는  $\alpha$ -glucosidase는 흡수된 이당류나 다당류와 결합하여 단당류로 분해시킴으로써 당의 소화과정의 마지막 단계를 촉매 하여 포도당을 생성하는 효소이다.  $\alpha$ -glucosidase 저해제들은 과당류와 이당류의 소화를 특이적으로 저해하여 소장 전체에 걸쳐 소화가 지연되도록 하며, 음식물 섭취 후 단당류 흡수의 지연은 식후 혈당치의 증가를 상당히 낮추준다.<sup>30</sup> 따라서 제 2형 당뇨병환자에서 가장 문제가 되는 식후 혈당의 급격한 증가를 예방하는 요법으로서 소장의  $\alpha$ -glucosidase를 저해하는 연구가 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다.<sup>27,31-33</sup>

본 연구에서는 상지 및 상백피 추출물과 이들의 주요성분의  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제 효과 측정 결과, 상지와 상백피 추출물 모두  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었고, 기질이 말토오스일 때 보다 수크로오스 일 때 강한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 보였다. 또한 주요성분 중 OXY에서 상지 및 상백피와 유사한 억제능이 관찰되었다. Caco-2 세포에서 포도당 및 과당 흡수 측정 결과, 상지와 상백피 추출물 모두 포도당 및 과당 흡수 억제능을 확인 할 수 있었으며, 특히 과당에서 흡수 저해능이 강하게 나타났다.

Caco-2 세포를 이용한 포도당 및 과당 흡수 측정 실험은 인체 장내 흡수 시스템을 비슷하게 구현하며, 오래 전부터 흡수 및 이동을 확인하는 실험에 사용되어 왔다.<sup>34-40</sup>

이와 함께 본 연구에서는 *in vitro* 시험 결과를 검증하기 위해 STZ로 고혈당을 유도한 모델동물을 사용하여 상지 및 상백피의 식후혈당 조절기능을 확인해보았다. STZ 복강투여 후 모델동물의 공복혈당은 220.625 mg/dL인 것으로 나타나 당뇨 유도 동물모델 ( $\geq 126$  mg/dL)이 잘 만들어졌음을 확인하였다.<sup>41</sup> STZ당뇨 유도 동물모델에서 28일간 상지 및 상백피 경구투여 후 경구당부하 검사 결과, 최고혈중농도 도달시간 (T max)이 당뇨대조군에 비해 상지와 상백피, OXY 섭취군에서 유의적으로 차이를 보였다. 이는 상지 및 상백피 섭취가  $\alpha$ -glucosidase 활성을 억제하여 최고혈중농도에 도달하는 시간을 지연하는 효과로 볼 수 있다. 또한 경구당부하 후, 꼬리정맥에서 혈당을 측정한 결과 상지와 상백피를 단회섭취한 고용량시험군의 30분대 혈당에서 유의적인 감소효과를 나타내었으며, 최고혈중농도 (C max)가 당뇨대조군에 비해 상지, 상백피 고용량 섭취군에서 유의적으로 낮은 농도를 보였지만 단일물질인 OXY 투여군에서는 유의미한 효과를 발견할 수 없었다. 따라서 상지 및 상백피의 지표물질인 OXY는 단일성분일 때보다 복합성분으로서 기타 플라보노이드 성분들과 혈당강하에 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

결론적으로 상지 및 상백피 추출물의 투여는 streptozotocin 당뇨유발 동물모델에서 포도당과 과당 흡수를 저해하며,  $\alpha$ -glucosidase 활성을 억제하여 식후혈당을 조절하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 상지 및 상백피 추출물이 효과적인 식후혈당 조절을 통해 혈당강하를 목적으로 한 기능성 소재 개발 가능성이 있음을 의미한다. 향후에는 상지 및 상백피 추출물이 혈당조절 뿐만 아니라 체장 및 간에서 인슐린 조절에 미치는 영향을 고려한 메커니즘 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

상지 및 상백피 추출물의 식후혈당조절 효과를 확인하기 위하여 Caco-2세포와 Streptozotocin 당뇨유발 동물을 사용하여 시험하였다. Caco-2 세포를 이용하여 상지·상백피 추출물의 포도당 및 과당 흡수 저해 능력을 확인하였으며, 특히 과당 흡수를 저해하는 효과가 강하게 나타났다. 말토오스와 수크로오스를 이용한  $\alpha$ -glucosidase 분석을 통해 상지와 상백피 추출물 모두 수크로오스에 대한  $\alpha$ -glucosidase의 강한 저해활성을 보였다. 시험동물 모델에서는 당뇨 유도를 위해 앞서 2주간 고지방 식이를 급여하



였으며, streptozotocin 복강투여 후 공복혈당이 126 mg/dL 이상을 기준으로 하여 당뇨 유도모델이 형성되었음을 확인하였다. 상지 및 상백피 추출물을 단회투여 하여 경구 당부하 검사 결과, 30분내에서 당뇨유도군과 비교했을 때 상지와 상백피 추출물 섭취군에서 모두 혈당이 유의적으로 감소하였다. 또한 28일간 경구투여하여 경구당부하를 측정하였을 때 최고혈중농도에 도달하는 시간을 지연시키는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로 상지 및 상백피 추출물은 식후혈당 조절을 통해 항당뇨 효과를 갖음을 알 수 있었으며, 이는 혈당강하를 목적으로 한 기능성 소재 개발 가능성으로 판단된다. 향후에는 상지 및 상백피 추출물이 췌장 및 간에서 혈당조절에 미치는 영향을 메커니즘 분석을 통해 추가적으로 연구해야 할 것으로 사료된다.

## References

- Task Force Team For Basic Statistical Study of Korean Diabetes Mellitus. Report of task force team for basic statistical study of Korean diabetes mellitus: diabetes in Korea 2007. 1st ed. Seoul: Goldfishery; 2007. p.1-57.
- Lee SY, Park SL, Nam YD, Yi SH, Lim SI. Anti-diabetic effects of fermented green tea in KK-A y diabetic mice. *Korean J Food Sci Technol* 2013; 45(4): 488-494.
- Jung JK, Park YK. Antidiabetic effect of So-Dang-Hwan in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Herbol* 2009; 24(1): 159-167.
- Park KS, Ko SK, Chung SH. Comparisons of antidiabetic effect between Ginseng Radix alba, Ginseng Radix rubra and Panax Quinquefoli radix in MLD STZ-induced diabetic rats. *J Ginseng Res* 2003; 27(2): 56-61.
- Salimifar M, Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. A review on natural products for controlling type 2 diabetes with an emphasis on their mechanisms of actions. *Curr Diabetes Rev* 2013; 9(5): 402-411.
- Zhu YP. Chinese materia medica: chemistry, pharmacology and applications. Boca Raton (FL): CRC Press; 1998.
- Chae JY, Lee JY, Hoang IS, Whangbo D, Choi PW, Lee WC, Kim JW, Kim SY, Choi SW, Rhee SJ. Analysis of functional components of leaves of different mulberry cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2003; 32(1): 15-21.
- Lee WC, Kim AJ Kim SY. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci Ind* 2003; 36(3): 2-14.
- Kim JY, Chung HI, Jung KO, Wee JH, Kwon O. Chemical profiles and hypoglycemic activities of mulberry leaf extracts vary with ethanol concentration. *Food Sci Biotechnol* 2013; 22(5): 1443-1447.
- Park JM, Bong HY, Jeong HI, Kim YK, Kim JY, Kwon O. Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart control Wistar rats. *Nutr Res Pract* 2009; 3(4): 272-278.
- Kim JY, Kwon HJ, Jung JY, Kwon HY, Baek JG, Kim YS, Kwon O. Comparison of absorption of 1-deoxynojirimycin from mulberry water extract in rats. *J Agric Food Chem* 2010; 58(11): 6666-6671.
- Kwon HJ, Chung JY, Kim JY, Kwon O. Comparison of 1-deoxynojirimycin and aqueous mulberry leaf extract with emphasis on postprandial hypoglycemic effects: in vivo and in vitro studies. *J Agric Food Chem* 2011; 59(7): 3014-3019.
- Kim JY, Choi BG, Jung MJ, Wee JH, Chung KH, Kwon O. Mulberry leaf water extract ameliorates insulin sensitivity in high fat or high sucrose diet induced overweight rats. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2011; 54(4): 612-618.
- Chung HI, Kim J, Kim JY, Kwon O. Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: Randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *J Funct Foods* 2013; 5(3): 1502-1506.
- Kim JY, Mok O, Won P, Won K. Mulberry leaf extract improves postprandial glucose response in prediabetic subjects: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Med Food* 2015; 18(3): 306-313.
- Wei H. Morus alba L. 桑 (Sang, White Mulberry). In: Liu Y, Wang Z, Zhang J, editors. Dietary Chinese Herbs: Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence. Wien: Springer; 2015. p.721-730.
- Zhang Z, Shi L. Anti-inflammatory and analgesic properties of cis-mulberroside a from Ramulus mori. *Fitoterapia* 2010; 81(3): 214-218.
- Ham I, Jeong E, Lee B, Choi H. The study on anti-hypertensive and anti-diabetic effect of mori ramulus. *Korean J Herbol* 2008; 23(2): 203-212.
- Lim CY, Lim SH, Cho SI. Anti-oxidative effects of Mori folium, Mori ramulus and Mori cortex radidus. Thesis Collect Res Inst Korean Med 2014; 22(2): 93-101.
- Yoon SH, Jung SY, Ha H. Hypoglycemic and enzyme effects of the water extract of Mori radidis cortex in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Hyg Sci* 2001; 7(2): 119-123.
- 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 Nutr* 2015; 44(6): 823-831.
- Choi SW, Jang YJ, Lee YJ, Leem HH, Kim EO. Analysis of functional constituents in mulberry (Morus alba L.) twigs by different cultivars, producing areas, and heat processings. *Prev Nutr Food Sci* 2013; 18(4): 256-262.
- Jang YJ, Leem HH, Jeon YH, Lee DH, Choi SW. Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Morus root bark. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2015; 44(7): 1090-1099.
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94(1-2): 57-63.
- Asano N, Oseki K, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. N-containing sugars from Morus alba and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res* 1994; 259(2): 243-255.
- Park SY, Kim JS, Lee BH, Lim SC, Lee SN, Leem KH, Lee KM. Whitening effects of Mori ramulus, Mori cortex radidis and Mori folium herbal-acupuncture solution after fermentation and heating. *J Korean Acupunct Moxibustion Soc* 2009; 26(1): 91-98.
- Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. In vitro studies of eggplant (Solanum melongena) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresour Technol* 2008; 99(8): 2981-2988.
- Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type

- 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2005; 65(3): 385-411.
29. Avignon A, Radauceanu A, Monnier L. Nonfasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20(12): 1822-1826.
30. Lam SH, Chen JM, Kang CJ, Chen CH, Lee SS.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the seeds of *Syagrus romanzoffiana*. *Phytochemistry* 2008; 69(5): 1173-1178.
31. Kim SM, Lee YM, Kim MJ, Nam SY, Kim SH, Jang HH. Effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb. water extract on  $\alpha$ -glucosidase inhibition and glucose uptake in C2C12 skeletal muscle cells. *Korean J Food Nutr* 2013; 26(4): 806-813.
32. Shim YJ, Doo HK, Ahn SY, Kim YS, Seong JK, Park IS, Min BH. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial blood glucose. *J Ethnopharmacol* 2003; 85(2-3): 283-287.
33. Hogan S, Zhang L, Li J, Sun S, Canning C, Zhou K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting  $\alpha$ -glucosidase. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7(1): 71.
34. Hidalgo JJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 736-749.
35. Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M, Terao J. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J Nutr* 2002; 132(7): 1956-1961.
36. Oitate M, Nakaki R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y. Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2). *Biopharm Drug Dispos* 2001; 22(1): 23-29.
37. Vaidyanathan JB, Walle T. Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm Res* 2001; 18(10): 1420-1425.
38. Walle UK, Galijatovic A, Walle T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol* 1999; 58(3): 431-438.
39. Kuo SM. Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal Caco-2 cells. *Life Sci* 1998; 63(26): 2323-2331.
40. Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J* 2007; 21(2): 366-377.
41. Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY, Kwon O. Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8(1): 18.