

C57BL/6N *db/db* 생쥐에서 복분자 미숙과 에탄올 추출물의 항당뇨 효과

최혜란¹ · 이수정¹ · 류태호^{1,*}

¹(재)베리&바이오식품연구소

Antidiabetic effects of unripe black raspberry ethanol extracts in C57BL/6N *db/db* mice

Hye Ran Choi¹, Su Jung Lee¹, and Tae Ho Ryu^{1,*}

¹Berry&Biofood Research Institute

Abstract This study aimed to verify the antidiabetic effects of the unripe black raspberry extract (UBRE) in obese diabetic mice. For the experiment, animal model mice were divided into six groups: normal control, diabetic control, three experimental groups (treated with 75, 150, and 300 mg/kg single dose of UBRE), and a positive control (200 mg/kg metformin). The groups treated with 300 mg/kg UBRE and metformin had significantly reduced blood glucose and triglyceride levels in the diabetic mice compared to those in the vehicle control group. In addition, histopathological evaluation showed that UBRE increased the Langerhans area, cell number, and insulin concentration in the pancreatic islets of *db/db* mice. Therefore, UBRE exerts significant antidiabetic effects by decreasing the blood glucose and lipid levels, suggesting that it can be consumed as a functional diet for diabetic patients.

Keywords: diabetic mice, unripe black raspberry extracts, blood glucose, insulin, triglyceride

서 론

당뇨병의 치료와 예방을 위해 전 세계적으로 많은 연구가 진행되었고, 새로운 당뇨 치료약물이 개발되었음에도 불구하고 당뇨병의 유병률은 여전히 증가하는 추세이다(Wild 등, 2004). 당뇨병은 인슐린이 분비되지 않거나 인슐린의 작용력이 감소하여 나타나는 것으로 전자는 제1형 당뇨병에, 그리고 후자는 제2형 당뇨병에 속한다. 제2형 당뇨병은 전체 당뇨병의 90% 이상을 차지하고 주로 비만 환자에게 나타나는 인슐린 저항성과 상대적 인슐린 결핍이 복합적으로 작용하여 포도당의 대사 장애를 초래하는 만성적인 질병이다(Holman 등, 2008). 근육, 간, 그리고 지방 조직에서 인슐린 작용이 저하되어 인슐린 저항성이 나타날 때 췌장의 베타세포가 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 만큼 인슐린을 분비해야 정상혈당을 유지할 수 있지만 그렇지 않을 경우 인슐린이 분비되지 않아 당뇨병이 유발된다(DeFronzo 등, 1992; Kahn, 2003). 제2형 당뇨병은 일차적으로 식이 및 운동을 통한 비약물적 치료를 시행하더라도 혈당 조절이 용이치 않아 경구용 혈당 강하제나 인슐린의 투여가 요구되는 경우가 많다. 경구용 혈당 강하제로는 sulfonylurea 제제, biguanide계 제제가 많이 사용된다. Biguanide계 메트포민은 간에서 포도당신생합성을 억제하고 근육이나 지방세포에 포도당이 흡수되는 것을 촉진시키며 대사증후군을 억제하여 제2형 당뇨 치료제로 잘 알려져 있는 약

물이다. 특히 최근에는 메트포민이 간과 근육에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 활성화시켜 혈당을 낮춘다고 알려져 있다(Davis 등, 2006; Musi 등, 2002; Zhou 등, 2001). 하지만 메트포민을 이용한 치료요법은 구토, 복부 불편감, 또는 복부 팽만감 등의 소화기계통의 부작용을 주로 많이 일으키며, 이러한 부작용으로 인해 당뇨 치료를 중단하는 경우가 상당히 많은 것으로 보고된 바 있다(Altun 등, 2014). 게다가 일부 신장기능이 저하된 당뇨 환자에게 지속적으로 메트포민을 투여할 경우 혈액 내 축적된 메트포민이 간에서 젖산이 당으로 전환되는 작용을 억제하여 혈액 내 젖산 농도를 상승시킴으로써 호흡곤란이나 복부 통증 등을 발생시킨다는 연구 결과도 있다(Kim 등, 2012). 따라서 이와 같은 부작용을 최소화하고 장기적으로 복용했을 때에도 안전하며 비정상적인 혈당 상승을 조절할 수 있는 천연자원소재의 발굴 및 식품 개발이 절실하게 요구되고 있다.

당뇨병은 근원적으로 치료할 수 있는 방법이 없기 때문에 예로부터 많은 약초들을 당뇨 치료제로 사용하여 왔다(Kim, 1994). 민간에서 쓰이고 있는 약물의 상당수는 그 효과가 제대로 밝혀지지 않은 것이 대다수이며 어떤 기전으로 혈당을 낮추는지에 대해 연구된 내용 역시 전무한 실정으므로, 여러 가지 천연소재의 효과에 대한 과학적인 접근이 요구된다. 고창군에서 재배되고 있는 복분자(*Rubus occidentalis*)는 폴리페놀 및 플라보노이드 등 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있고, 복분자 성분 중 ellagic acid는 폴리페놀 화합물로 항산화, 항암, 콜레스테롤 억제 등의 효과가 확인되었다(Lee 등, 2021). 복분자는 유리당과 무기질의 인, 철 및 칼륨이 많이 함유되어 있으며, 특히 유기산과 비타민C가 많이 포함되어 있어 항암활성(Kim 등, 2006), 면역증진효과(Lee 등, 2003), 항산화와 항균효과(Yoon 등, 2002), hepatitis B virus 억제(Kim 등, 1999), 콜레스테롤 개선(Choi 등, 2013; Choi 등, 2014;

*Corresponding author: Tae Ho Ryu, Berry&Biofood Research Institute, Gochang, Jeonbuk 56417, Republic of Korea
Tel: +82-63-560-5175
E-mail: ruteo@hanmail.net
Received April 26, 2022; revised June 24, 2022;
accepted June 26, 2022

Kim 등, 2013) 및 혈압개선(Jeong 등, 2014; Lee 등, 2014a; Lee 등, 2014b; Lee 등, 2015) 등 다양한 생리활성에 대한 효능이 밝혀진 바 있다. 당뇨와 관련하여 Kwon 등(2011)은 복분자 에탄올 추출물이 α -glucosidase의 활성을 억제시킴으로써 제2형 당뇨와 같은 당뇨 관련 질병의 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있고, Calvano 등(2019)은 인슐린 저항성이 있거나, 대사 증후군이 있는 성인이 베리류를 섭취한 후, 과체중 또는 식후 고혈당 및 고인슐린혈증이 개선되었다고 보고하였다. Hassan 등(2002)은 전통적으로 청정제, 수렴제로 사용되어 오던 *Rubus fruticosus L.* (black berry, RF) 추출물을 streptozotocin을 투여하여 당뇨를 유발한 흰쥐에게 섭취시켜(100 mg/kg) 식후 혈당을 관찰한 결과, 식후 6시간의 혈당 증가치가 RF 추출물 섭취군이 대조군에 비해 유의적으로 감소됨을 확인하였고, 생쥐를 대상으로 한 독성시험에서는 6 g/kg 수준까지 섭취할 경우 안정하다고 보고하였다. 따라서, 복분자는 당뇨병 치료제를 대체할 수 있는 천연물 제제의 가능성이 높다는 선행 연구 결과를 확인하였다. 그러나 혈당 조절에 있어서 복분자의 직접적인 효과에 대해서는 아직 조사된 것이 없으므로, 본 연구에서는 제2형 당뇨모델인 *db/db* 마우스에 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물을 투여하여 혈당조절 효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

복분자 미숙과 추출물 제조

본 연구에 사용된 복분자 미숙과는 전북 고창군에서 재배된 것을 구입하여 동결 건조한 후 실온에 보관하여 사용하였다. 동결 건조한 복분자 미숙과 50 kg에 50% 주정 10배수를 넣고 80°C 온도에서 2시간 동안 추출한 후 농축하고 동결 건조하였다(GMP설비, 전남식품산업연구센터). 이 과정을 2회 반복 진행하였다.

실험동물의 사육환경 및 식이

제2형 당뇨의 대표적인 동물모델인 8주령 수컷의 C57BL/KsJ-*lepr^{db}/lepr^{db}* (*db/db*) 당뇨 마우스와 비당뇨 C57BL/6N 마우스를 공급받아 사용하였다(Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis, IN, USA). 1주간의 적응기간을 거친 뒤 체중 및 공복혈당 수치를 바탕으로 군당 12마리씩 군 분리 한 후 11주간 실험하였고, 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 22±2°C, 습도는 50±5%를 유지하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(Purina Co., Seoul, Korea)와 펠릿 및 자외선 살균기로 여과 살균된 정제수를 사용하였다. 본 동물실험은 (재)베리&바이오식품연구소 효능평가센터 동물실험윤리위원회의 허가(BBRI-IACUC-12001)를 받아 시행하였다.

실험군의 구성 및 투여

실험군은 *db/db* 마우스 중에서 공복 시 혈당이 200 mg/dL 이상으로 당뇨 유발이 확인된 동물을 선발하여 5개 실험군으로 구분하고 C57BL/6N 마우스를 정상대조군으로 구성하여 총 6개의 그룹으로 구성하였다. *db/db* 마우스 실험군은 당뇨대조군과 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여군 그리고 제2형 당뇨의 치료목적으로 시판되는 물질인 메트포민(Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 투여하는 양성대조군으로 설정하였다. 메트포민은 간의 당 생성을 억제시키고 말초 인슐린 민감도를 상승시키며, 체중을 감소시키는 물질로 알려져 있다. 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 저농도(75 mg/kg), 중농도(150 mg/kg), 고농도(300 mg/kg)와 양성대조군(메트포민 200 mg/kg)을 0.3 mL의 증류

수에 용해시켜 경구용 주사기를 이용하여 11주간 매일 일정한 시간대(오전 10시)에 경구 투여하였고, 정상대조군과 당뇨대조군은 복분자 미숙과 추출물과 동일한 양의 증류수를 투여하였다.

체중 및 공복 혈당 측정

체중은 주 1회 간격으로 일정한 시간(오전 10시)에 디지털 계량기를 사용하여 측정하였으며, 혈당은 주 1회 실험 전 15시간 절식시킨 정상 및 당뇨모델 마우스 꼬리정맥의 전혈에서 blood glucose meter 및 test strip (Accu-Chek Performa, Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 측정값은 mg/dL로 나타내었다.

내당능 검사(Intraperitoneal glucose tolerance test)

실험 전 15시간 절식시킨 정상 및 당뇨모델 마우스를 꼬리정맥으로부터 채혈하여 혈당을 측정하고, 이어서 glucose (2 g/kg)를 PBS 0.3 mL에 용해시켜 복강투여를 한 후 0, 30, 60 및 120분 후의 혈당을 측정하였다.

혈액 채취 및 혈장 분리, 생화학적 분석

11주 식이 후 모든 실험동물은 15시간 동안 절식시키고 diethyl ether로 마취시킨 다음 개복 즉시 복대정맥을 통해 혈액을 얻었다. EDTA 튜브 내 혈액은 2,000×g에서 10분간 원심분리 한 다음 상층액을 분리하는 방법으로 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장에서 혈중 중성지방의 혈액생화학적 수치를 측정하였다.

혈중 인슐린 농도 측정

베타세포의 인슐린 분비는 주로 혈중 포도당 농도에 의해서 자극 받으며 스트레스와 약물 등에 의해서 영향 받기 때문에 공복 혈중 인슐린을 측정하였다. 측정은 Insulin Kit (ALPCO, Salem, NH, USA)를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

췌장의 병리조직학적 검사

적출된 췌장 조직의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하고, 증류수로 세척한 후 tissue processor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용해 processing하고 paraffin embedder (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 paraffin block을 제조하였다. 제조한 paraffin block은 microtome (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 4 μm로 자른 후 slide glass에 고정하였다. 절편한 slide를 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 후 광학현미경(Nikon eclipse e200, Nikon, Kanagaxa, Japan)으로 40, 100 또는 400배의 배율에서 검경하였다. 췌장의 병리조직학적 변화를 알아보기 위해 랑게르한스섬의 면적 변화와 세포 수를 관찰하였고, Image analyzer (Focus Technology, Hamburg, Germany)를 이용하여 얻은 각 개체의 측정값을 통해 군간 차이를 비교하였다.

췌장 조직의 인슐린 호르몬에 대한 면역조직학 검사

면역조직화학적 검사를 통해 췌장의 인슐린 분비 세포를 확인하기 위해 파라핀 고정시킨 췌장 조직을 4 μm 두께로 절편한 후, silicon코팅된 slide glass (Sigma-aldrich Co.)에 부착했다. 면역조직화학 염색은 Immunohistochemistry accessory kit (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)를 사용하였으며, xylene과 100% 농도의 에탄올로 탈파라핀 과정을 거친 후, peroxidase 활성을 제거하기 위한 과정으로 peroxidase quenching solution (Bethyl Laboratories, Inc.)에 30분간 부착시키고 IHC wash solution (PBS 완충액)에 세척한 뒤, ready-to-use IHC blocking reagent (Bethyl Laboratories, Inc.)를 사용하여 주변의 비특이적 반

응을 억제하였다. 마우스 인슐린 호르몬에 특이적인 일차항체 insulin (F49) pAb (Bioworld Technology, Inc., Louis Park, MN, USA)를 100배 희석하여 적용하고, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 일차항체에 반응시킨 조직은 IHC wash solution (Bethyl Laboratories, Inc.)으로 3차례 세척하고 biotin-conjugated anti-rabbit IHC antibody (Bethyl Laboratories, Inc.)에 1시간 동안 반응시켰다. 상온에서 avidin-biotin complex (ABC, Bethyl Laboratories, Inc.)에 30분간 반응시키고 IHC wash solution으로 3차례 세척 후, peroxidase의 기질인 diaminobenzidine (DAB, Bethyl Laboratories, Inc.)으로 발색시킨 다음, hematoxyline 대조염색을 하여 탈수, 투명화 및 봉입 과정을 거쳤다. 면역조직화학 염색을 통해 인슐린 분비 양성 세포에 특이적으로 반응하는 암갈색의 랑게르한스섬 세포 수를 광학현미경으로 관찰하였고, Image analyzer로 평균값 및 표준편차를 구하여 군간 차이를 비교하였다.

통계분석

모든 분석 자료는 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험결과는 SPSS (SPSS Inc, version 12.0, Chicago, IL, USA)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 통계처리 하였고, Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

체중의 변화

각 실험군에서 11주간의 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여 후 체중의 변화를 조사하였다(Table 1). 정상대조군에 비하여 제2형 당뇨병모델동물 *db/db* mouse인 당뇨대조군의 체중이 45.9% 증가하였고, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물을 투여한 실험군과 양성대조군에서는 당뇨 대조군과 비교해서 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p < 0.05$).

공복혈당 및 복강 내당능 검사

본 연구에 사용된 *db/db* 마우스들은 leptin에 대한 저항성이 발생되어 식욕이 조절되지 않아 결과적으로 비만이 나타나며, 성장할수록 혈당이 높아지는 특징을 갖는 제2형 당뇨병모델로 알려져 있다(Concidine 등, 1996). 본 실험에서는 9주령 *db/db* 마우스를 15시간 절식 후 매주 1회씩 혈당을 측정하였으며, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg과 양성대조군을 1일 1회 경구 투여하였다. 각 실험군의 혈당변화는 Fig. 1에 나타내었다. 정상대조군과 당뇨대조군은 실험 개시 전 평균 혈당이 각각 81.50 ± 9.44 와 205.86 ± 53.97 mg/dL로 측정되었으며, 11주 후 정상

Table 1. Changes of body weight in diabetic mice treated with UBRE (unripe black raspberry extracts) for 11 weeks

Items	NC ¹⁾	DC ²⁾	DC+UBRE75 ³⁾	DC+UBRE150 ⁴⁾	DC+UBRE300 ⁵⁾	DC+P ⁶⁾
Initial weight (g)	22.97±1.13*	42.83±2.06	42.20±2.37	41.14±1.67	41.17±2.56	42.03±1.68
Final weight (g)	26.32±1.69*	49.10±2.43	48.60±5.62	47.33±3.79	46.73±4.28	46.96±2.38
Weight gain (g/week)	0.25±0.14	0.46±0.2	0.68±0.41	0.59±0.29	0.63±0.27	0.48±0.23

¹⁾NC: normal control, ²⁾DC: diabetic control, ³⁾DC+UBRE75: 75 mg/kg/day, ⁴⁾DC+UBRE150: 150 mg/kg/day, ⁵⁾DC+UBRE300: 300 mg/kg/day, ⁶⁾DC+P: metformin 200 mg/kg/day. Values are mean±SD. n=10/group. * $p < 0.05$ vs diabetic control.

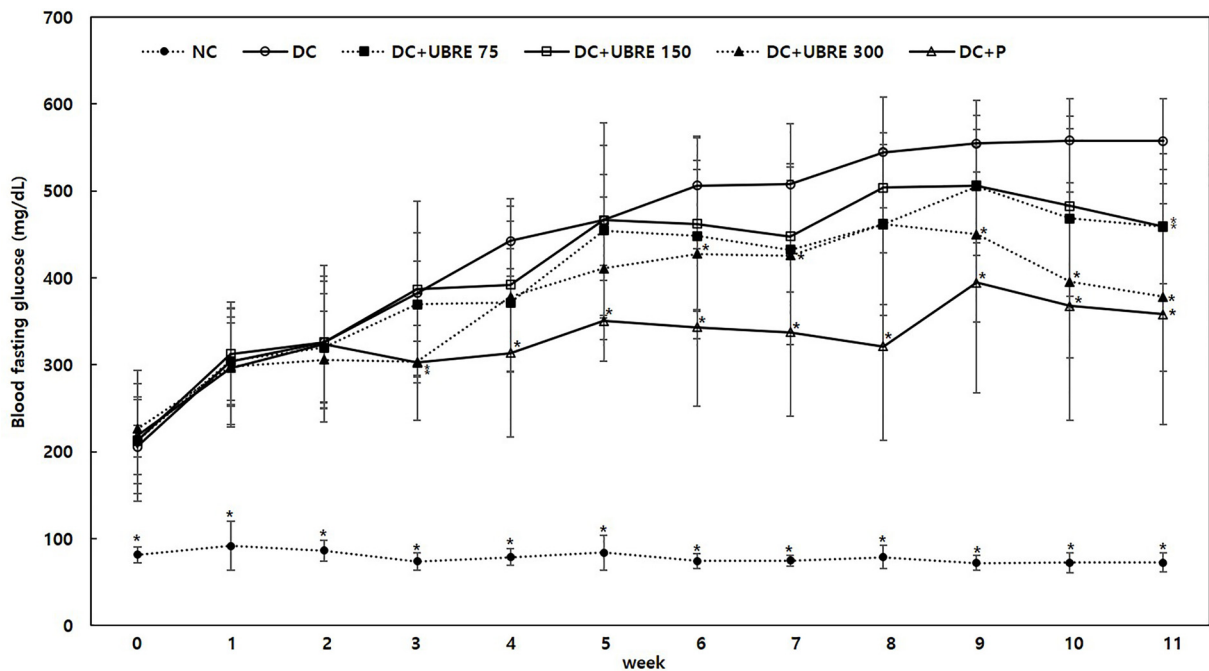


Fig. 1. Blood glucose in diabetic mice treated with UBRE for 11 week. NC: normal control, DC: diabetic control, DC+UBRE75: 75 mg/kg/day, DC+UBRE150: 150 mg/kg/day, DC+UBRE300: 300 mg/kg/day, DC+P: metformin 200 mg/kg/day. Values are mean±SD. n=10/group. * $p < 0.05$ vs diabetic control.

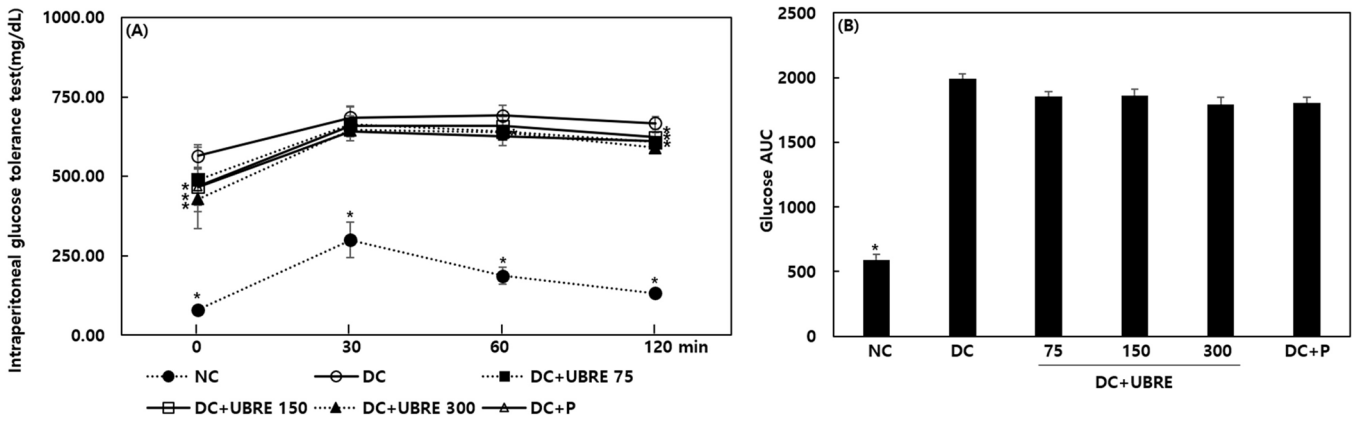


Fig. 2. Change in blood glucose levels by the glucose tolerance test (A) and its area under the curve (AUC) (B). Glucose at dose 2 mg/kg was intraperitoneally administered to the animals. NC: normal control, DC: diabetic control, DC+UBRE75: 75 mg/kg/day, DC+UBRE150: 150 mg/kg/day, DC+UBRE300: 300 mg/kg/day, DC+P: metformin 200 mg/kg/day. Values are mean±SD. n=10/group. **p*<0.05 vs diabetic control.

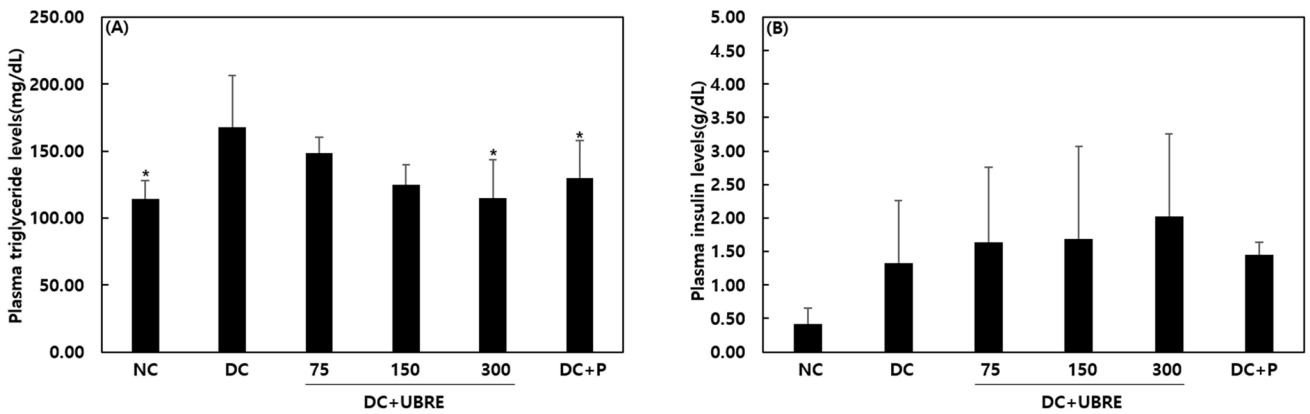


Fig. 3. Effect of UBRE on plasma Triglyceride(A) and insulin(B) level in diabetic mice. NC: normal control, DC: diabetic control, DC+UBRE75: 75 mg/kg/day, DC+UBRE150: 150 mg/kg/day, DC+UBRE300: 300 mg/kg/day, DC+P: metformin 200 mg/kg/day. Values are mean±SD. n=10/group. **p*<0.05 vs diabetic control.

대조군은 72.70±10.89 mg/dL로 정상 혈당치를 유지한 반면에 당뇨병대조군은 557.50±48.92 mg/dL로 초기 혈당치보다 63.1% 증가하였다. 11주 간 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg을 투여한 시험군은 혈당치가 각각 458.80±65.49, 459.11±83.83 및 378.11±85.63 mg/dL로 당뇨병대조군에 비해 각각 17.7, 17.6 및 32.1% 유의적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(*p*<0.05). 또한 양성대조물질인 메트포민을 11주간 투여한 실험군에서는 혈당치가 358.27±26.77 mg/dL로 당뇨병대조군보다 약 35.7% 정도 억제되는 효과가 나타났다(*P*<0.05).

복분자 미숙과 추출물의 혈당 조절 효과를 입증하기 위해 시험물질을 11주 동안 경구 투여한 후 부검을 시행하기 1일 전 내당능 검사를 실시하였다(Fig. 2A). 그 결과 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150, 300 mg/kg 투여군 및 양성대조군은 glucose를 복강 내 투여하고 60분이 경과된 후부터 당뇨병대조군에 비해 혈당이 감소하는 경향을 보였다(*p*<0.05). 그러나 각 군 간의 차이는 나타나지 않았다. 또한, 내당능 검사에 대한 곡선하면적(area under the curve)을 수치화하여 나타내는데(Le Floch 등, 1990), 수치가 낮을수록 식후 빠른 시간 내에 공복시의 혈당수치로 복원되는 것을 의미하며 체내의 내당능 조절을 평가하는 지표가 된다(Jenkins 등, 1981). 120분간 혈당 곡선하면적을 계산한 결과 당뇨병대조군(1991.2)과 비교하여, 복분자 미숙과 50% 에탄올

추출물 75 (1854.2), 150 (1862.6), 300 (1793) mg/kg 및 양성대조군(1807.2) 그룹에서 면적이 감소하는 경향은 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 2B).

혈당의 상승이 지속적으로 유지되는 상태를 당뇨병이라고 하며, 제2형 당뇨병 초기에 고혈당을 정상 수준으로 조절하는 것은 질환의 악화를 방지하는 것과 동시에 고혈압이나 다양한 심혈관계 관련 합병증으로의 진행을 억제할 수 있게 한다. Kim 등(1996)에 따르면 항균 및 항산화 효능이 뛰어난 오디를 4주간 섭취 시 streptozotocin에 의해 유발된 제1형 당뇨병모델 쥐에서 오디의 용량의존적으로 혈당이 감소했다는 이전의 연구결과가 있다. 본 연구 결과에서는 복분자의 미숙과 50% 에탄올 추출물이 제2형 당뇨병 모델에서 공복혈당을 감소시키고, 당부하 검사를 통해 추출물을 300 mg/kg의 고농도로 투여했을 경우 양성대조군으로 사용된 메트포민과 유사한 수치까지 혈당이 낮아지는 효과를 볼 수 있었다. 따라서 복분자 미숙과 추출물을 장기간 복용했을 경우 당뇨병에서 기인하는 심각한 합병증을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

혈중 중성지방 농도

제2형 당뇨병 환자에게 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증, 특히 고중성지방혈증으로 20-60%의 빈도로 나타나며

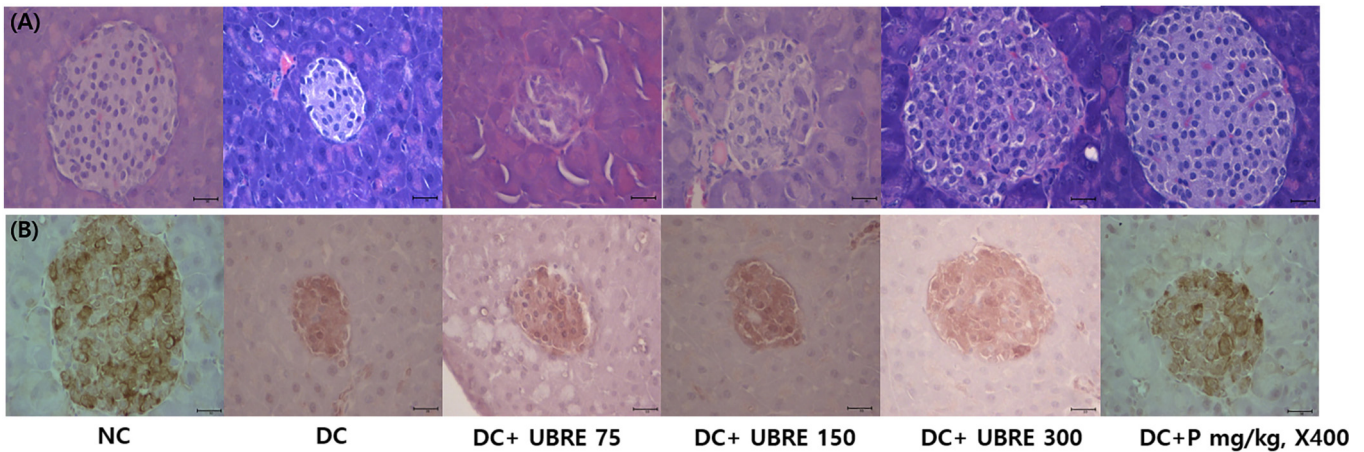


Fig. 4. Histopathological and immunohistochemical analysis of pancreatic islets in diabetic mice treated with UBRE for 11 weeks. H&E staining of pancreatic tissue (A). Immunohistochemistry (IHC) (B) against the insulin hormone in the pancreatic islets. Original magnification: $\times 100$, scale bar: 30 μm .

(Dunn, 1990; Rhee, 1990; Son, 1985), 이러한 고지혈증은 죽상경화증의 주요 위험인자의 하나로 작용하여 결과적으로 허혈성 심장질환을 비롯한 당뇨병의 심혈관계합병증 발생에 영향을 미친다(Pyorala, 1987). 이에 본 연구에서 혈중 중성지방 농도를 측정해본 결과, 당뇨대조군은 $167.55 \pm 38.84 \text{ mg/dL}$ 로 $114.10 \pm 13.96 \text{ mg/dL}$ 인 정상대조군과 비교했을 때 중성지방 수치가 약 31.9% 정도 높게 나타났다. 양성대조군은 $130.00 \pm 27.84 \text{ mg/dL}$ 로 당뇨대조군보다 유의성 있게 중성지방이 감소되었으며, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg 투여군은 각각 148.50 ± 11.62 , 124.75 ± 15.20 및 $114.64 \pm 28.97 \text{ mg/dL}$ 로 용량 의존적으로 중성지방 농도가 감소되었다(Fig. 3A). Choi 등(2014)의 연구 결과에서 복분자 미숙과 물 추출물이 고지질 동물모델의 중성지방을 감소시키는 경향을 보이므로, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 역시 전반적인 혈당조절을 개선시켜 간에서 중성지방 합성이 감소됨으로써 혈청 내 중성지방의 상승이 억제된 것으로 생각된다.

혈중 인슐린 농도

복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물에 의한 혈당 감소 효과와 인슐린 분비의 연관성을 확인하기 위해 추출물의 경구 투여 11주 후 마우스의 혈액에서 인슐린 농도를 분석했다(Fig. 3B). 당뇨대조군은 $1.32 \pm 0.94 \mu\text{g/mL}$ 로 $0.42 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ 인 정상대조군에 비해 68.2% 높은 인슐린 수치를 보였고, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg 투여군은 각각 1.64 ± 1.11 , 1.69 ± 1.38 및 $2.03 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$ 로 당뇨대조군보다 약간 높은 수준이었으며, 양성대조군은 $1.46 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ 로 당뇨대조군과 비슷한 경향을 나타내었으나, 모든 군에서 통계적 유의성이 나타나지 않았다. Kim(2003)은 STZ로 당뇨를 유도한 흰쥐에게 복분자 추출물 500 mg/kg 투여하였더니, 당뇨대조군과 비교하였을 때, 복분자 섭취군에서 혈당 증가곡선의 면적은 유의적으로 감소되었으나, 혈중 인슐린 농도의 변화는 보이지 않았고, Park 등(2019)은 고지방식이 유도 당뇨모델 마우스에서 한방추출물을 처리했을 때 혈청 내 인슐린의 농도가 증가 되었는데, 이는 췌장 베타세포에서 인슐린 분비능의 보상적 증가가 유도됨으로써 혈당이 조절될 것이라고 보고하였다. 인슐린저항성은 주어진 인슐린 농도에서 인슐린에 대한 체내 조직의 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태를 말하며, 고인슐린 혈증은 정상혈당을 유지하기 위해서

는 정상인보다 훨씬 많은 양의 인슐린이 필요하므로, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여군에서 나타난 혈중 인슐린 농도의 증가는 인슐린저항성을 극복하기 위한 인슐린 분비 과다 상태 때문일 수 있다. 따라서, 복분자 추출물이 인슐린 저항성을 정상으로 개선시키지는 못하지만 공복혈당을 감소시키고 혈중 중성지방 농도를 감소시키는 결과로 보아 췌장 기능을 부분적으로 회복시켜 인슐린 분비능을 증가시키고, 이러한 인슐린 분비촉진이 혈중유리지방산 농도와 체내 지방산화를 감소시킴으로써 말초조직에서의 인슐린 감수성을 호전시켰을 것으로 가정할 수 있으나, 혈당 감소효과와 인슐린 분비와의 연관성을 설명하기에는 어려움이 있다.

췌장의 병리조직학적 검사 및 인슐린 분비 세포의 면역조직학적 특성

췌장의 병리조직검사 결과, 당뇨대조군에서 정상대조군에 비해 인슐린을 분비하는 베타세포로 이루어진 랑게르한스섬의 형태학적 손상이 나타났으며, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg 투여군과 양성대조군은 당뇨대조군보다 랑게르한스섬 크기가 증가된 것을 볼 수 있었다(Fig. 4A). 췌장 랑게르한스섬 면적은 정상대조군과 당뇨대조군이 각각 749 ± 55 및 $538 \pm 63 \mu\text{m}^2$ 로 당뇨대조군의 랑게르한스섬 면적이 28.1% 정도 유의적으로 작게 나타났다($p < 0.05$)(Table 2). 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg 투여군의 랑게르한스섬 면적은 각각 645 ± 39 , 682 ± 60 및 $743 \pm 61 \mu\text{m}^2$ 로 투여한 추출물의 농도 의존적으로 랑게르한스섬의 면적이 증가된 것을 알 수 있었다. 특히 300 mg/kg 투여군은 당뇨대조군과 비교하였을 때, 27.6% 정도 유의적으로 랑게르한스섬 면적이 증가했으며, 정상대조군의 면적과 유사한 수준까지 회복되었다($p < 0.05$). 또한 췌장 랑게르한스섬 세포 수 역시 정상대조군은 102 ± 14 개인데 비해, 당뇨대조군은 46 ± 16 개로 당뇨대조군에서 랑게르한스섬 세포가 유의적으로 적게 관찰되었다($p < 0.05$). 반면에 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg 투여군의 랑게르한스섬 세포 수는 각각 64 ± 15 , 67 ± 11 및 90 ± 13 개로 당뇨대조군에 비해 유의성 있게 랑게르한스섬 세포 수가 증가하였다($p < 0.05$).

베타세포의 기능 저하는 인슐린저항성 제2형 당뇨병의 대표적인 병변이므로, 인슐린 항체를 이용한 면역조직학적 염색을 통해 췌장 내 베타세포의 형태학적 구조와 인슐린 생산 경향을 살펴

Table 2. Effects of UBRE on islets of Langerhans in diabetic mice

Items	NC ¹⁾	DC ²⁾	DC+UBRE75 ³⁾	DC+UBRE150 ⁴⁾	DC+UBRE300 ⁵⁾	DC+P ⁶⁾
Size of Langerhans islets (μm^2)	749±55*	538±63	645±39*	682±60*	743±61*	703±55*
Number of Langerhans islet cells	102±14*	46±16	64±15*	67±11*	90±13*	81±17*
Number of insulin-immunoreactive cells	110±15*	31±90	48±14	66±13*	92±12*	86±11*

¹⁾NC: normal control, ²⁾DC: diabetic control, ³⁾DC+UBRE75: 75 mg/kg/day, ⁴⁾DC+UBRE150: 150 mg/kg/day, ⁵⁾DC+UBRE300: 300 mg/kg/day, ⁶⁾DC+P: metformin 200 mg/kg/day. Values are mean±SD. n=10/group. * $p<0.05$ vs diabetic control.

보았다. 인슐린 호르몬에 대한 췌장 조직의 면역조직학적 검사를 시행하고 광학현미경으로 관찰했을 때 마우스 인슐린 항체에 특이적인 반응은 DAB 발색에 의하여 암갈색으로 관찰되었다(Fig. 4B). 인슐린 호르몬에 특이적인 항체를 이용하여 면역염색을 실시하고 양성 반응을 보이는 췌장 랑게르한스섬 속 세포 수를 측정 한 결과, 당뇨대조군은 31±90개인데 비해 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 75, 150 및 300 mg/kg 투여군은 각각 48±14, 66±13 및 92±12개로 추출물 투여에 의해 인슐린 호르몬 항체에 특이적으로 반응하는 세포 수가 유의성 있게 증가됨을 확인할 수 있었다(Table 2). 본 연구에서 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여가 베타세포의 용적과 형태에 이로운 효과를 보였지만, 인슐린 분비능에서 차이를 보이지 않은 것은, 제2형 당뇨병이 진행하면서 베타세포의 형태 변화 이전에 베타세포의 기능부전이 먼저 발생하며, 본 실험의 11주 동안에 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여가 베타세포의 형태 변화는 예방하였으나 기능부전의 발생은 예방하지 못했을 가능성이 있겠다. 10주령의 당뇨병 동물 모델인 OLETF 쥐에서 thiazolidinediones (TZD)계 약물 투여가 베타세포의 용적 및 형태변화는 예방하였으나, 인슐린 분비능을 완전히 정상화 하지 못했다는 연구 결과는 본 연구의 결과를 뒷받침한다(Noh 등, 2007). 혈당의 저하는 인슐린 호르몬에 의해 조절되며 인슐린 호르몬은 랑게르한스섬에서 분비된다. 이를 감안 하면, 본 연구결과에서 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여가 구조적으로 손상된 랑게르한스섬을 회복시켜 랑게르한스섬 면적 및 세포 수를 증가시켰으나, 인슐린 분비능을 개선시키지는 않은 것으로 나타났다. 일반적으로 당뇨환자에서 1차적 자율신경의 조절에 의해 혈당이 감소하고, 이후 낮아진 혈당에 의한 인슐린 분비 감소로 나타나는 경우가 있지만, 고인슐린증에 기인하는 비만과 조직의 과잉 성장유발, 혈압상승, 그리고 동맥벽 대사장애에 의한 동맥경화 등(Young과 Stout, 1987)이 악화되어 오는 심혈관계 질환, 신증, 망막증 등을 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물이 조절할 수 있을지의 여부는 많은 추가연구가 필요하다.

요 약

본 연구는 복분자 미숙과의 항당뇨 활성을 알아보기 위해 유전적 당뇨 질환 동물모델인 *db/db* 마우스에서 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물을 11주간 경구 투여한 후 당뇨병 개선 효과를 조사하였다. 체중 측정 결과, 정상대조군에 비하여 당뇨대조군의 체중이 45.9% 증가하였으나 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여한 실험군들의 체중 변화는 보이지 않았다. 시료 투여 11주 후 공복혈당을 측정했을 때 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여군에서는 농도 의존적으로 혈당 상승이 억제되었으며, 복강 내당능 시험을 통해 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물이 양성 대조군과 유사한 경향으로 혈당을 감소시키는 것을 확인하였다. 혈중 중성지방 수치 역시 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여군은 농도 의존적으로 중성지방의 농도가 감소되었고, 혈중 인

슐린의 농도는 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여군이 당뇨대조군보다 약간 높은 수준으로 나타났으나 군간 유의성은 없었다. 췌장의 병리조직학적 검사 결과, 당뇨대조군에서 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포로 이루어진 랑게르한스섬의 형태학적 손상이 나타났으며 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여에 의해 손상이 억제됨으로써 랑게르한스섬의 면적 및 세포 수가 당뇨대조군에 비해 증가했음을 확인하였다. 또한 인슐린 항체를 이용하여 면역 염색을 통해 췌장 내 베타세포의 형태학적 구조를 확인해 보면 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 투여군들에서 인슐린을 분비하는 랑게르한스섬 세포 수가 유의하게 증가되었음을 알 수 있었다. 따라서 위 결과를 종합해 볼 때 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물이 혈당 강하에 효과가 있으며, 이를 위한 목적으로 장기간 섭취했을 때 항당뇨에 도움이 될 것이라고 사료된다.

References

- Altun E, Kaya B, paydas S, Sariakcal B, Karayaylal I. Lacticacidosis induced by metformin in a chronic hemodialysis patientwith diabetes mellitus type 2. *Hemodial Int.* 18: 529-531 (2014)
- Calvano A, Izuora K, Oh EC, Ebersole JL, Lyons TJ, Basu A. Dietary berries, insulin resistance and type 2 diabetes: an overview of human feeding trials. *Food Funct.* 10: 6227-6243 (2019)
- Choi HR, Lee JH, Lee SJ, Lee MJ, Jeong JT, Lee TB. Effects of Unripe Black Raspberry water extract on lipid metabolism and stress in mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 489-497 (2014)
- Choi HR, Lee SJ, Lee JH, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. Cholesterol-lowering effects of unripe black raspberry water extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1899-1907 (2013)
- Concidence RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Macro CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334: 292-295 (1996)
- Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 55: 496-505 (2006)
- Defronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-353 (1992)
- Dunn FL. Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 6: 47-61 (1990)
- Hassan J, Mhamed M, Mohamed E. Hypoglycemic effect of *Rubus Fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 81: 351-356 (2002)
- Holman RR, paul SK, Betel MA, Matthew DR, Neil HA. 10-Year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 359: 1577-1589 (2008)
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 362-366 (1981)
- Jeong HS, Hong SJ, Lee TB, Kwon JW, Jeong JT, Joo HJ. Effects of

- black raspberry on lipid profiles and vascular endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Phytother. Res.* 28: 1492-1498 (2014)
- Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46: 3-19 (2003)
- Kim HY. Antidiabetic effects of Bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel). MS thesis, Inje University, Kimhae-si, Korea. (2003)
- Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY. Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14: 206-211 (2006)
- Kim, OK. Diabetes and traditional therapy. *Diabetes Metab. J.* 18: S61-S64 (1994)
- Kim OK, Oak CH, Jeong JM, Lee JW, Shin MH, Kim NH. A case of metformin-induced lactic acidosis with acute kidney injury misdiagnosed as hepatorenal syndrome in a cirrhosis patient. *Korean J. Med.* 82: 241-246 (2012)
- Kim SK, Kim CK, Lee KS, Kim JH, Hwang HJ, Jeoung Di, Choe JS, Won MH, Lee HS, Ha YG, Kwon YG, Kim YM. Aqueous extract of unripe *Rubus coreanus* fruit attenuates atherosclerosis by improving blood lipid profile and inhibiting NF- κ B activation via phase II gene expression. *J. Ethnopharmacol.* 146: 515-524 (2013)
- Kim TG, Park MS, Han HM, Kang SY, Jung KK, Rheu HM, Kim SH. Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on Hepatitis B virus replication in HepG2 2.2.15 cells. *Yakhak Hoeji.* 43: 458-463 (1999)
- Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J. Seric. Sci.* 38: 100-107 (1996)
- Kwon JW, Lee HK, park HJ, Kwon TO, Choi HR and Song JY. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 19: 325-333 (2011)
- Lee JH, Choi HR, Lee SJ, Lee MJ, Jang JE, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. Anti-hypertensive effects of Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 483-490 (2015)
- Lee JH, Choi HR, Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Kwon JW et al. Blood pressure modulating effects of Black Raspberry extracts *in vitro* and *in vivo*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 375-384 (2014a)
- Lee JH, Jeong KO, Im SY, Lee SJ. Analytical method validation of ellagic acid as an antioxidative marker compound of the *Rubus occidentalis* extract. *Korean J. Food Preserv.* 28: 663-673 (2021)
- Lee MK, Lee HS, Choi Gp, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11: 5-12 (2003)
- Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Chae KS, Jeong JT, Lee TB. Improvement of cholesterol and blood pressure in fruit, leaf and stem extracts from Black Raspberry *in vitro*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 22: 177-187 (2014b)
- Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. Blood glucose area under the curve: Methodological aspects. *Diabetes Care* 13: 172-175 (1990)
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm p, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljuqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodear LJ. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2074-2081 (2002)
- Noh JH, Hong SH, Lee KH, Min KM, Yang TY, Lee MS, Kim KW, Lee MK. Thiazolidinediones on insulin resistance and insulin secretion in obese diabetic OLETF rats. *J. Korean Diabetes* 31: 33-43 (2007)
- Park KH, Kang SY, Kang A, Jung HW, park YK. Anti-diabetic effects of the extract from *Atractylodes lancea*, *Anemarrhena asphodeloides* and *Cinnamomum Cassia* mixture in high fat diet-induced diabetic mice and regulation of the function in C2C12 mouse skeletal muscle cells. *Kor. J. Herbol.* 34: 79-89 (2019)
- Pyorala K, Laakso M, Unsitupa M. Diab & atherosclerosis: An epidemiologic view. *Diab. Metab. Rev.* 3: 453-524 (1987)
- Rhee BD. Diabetes and hyperlipidemia. *J. Korea Diabetes* 14: 13-22 (1990)
- Son HY. Lipid metabolism in diabetes mellitus. *J. Korean Diabetes* 9: 159-164 (1985)
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanus* fruit. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 898-904 (2002)
- Young IR, Stout RW. Effects of insulin and glucose on the cells of the arterial wall : Interaction of insulin with dibutyl cyclic AMP and low density lipoprotein in arterial cells. *Diabetes* 13: 301-306 (1987)
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053 (2004)
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Miller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108: 1167-1174 (2001)