

db/db 마우스에서 수풍순기환의 혈당강하 활성 및 기전연구

이성현¹ · 안세영¹ · 두호경¹ · 정성현[#]

¹경희대학교 한의과대학, 약학대학

Blood Glucose Lowering Activity and Mechanism of Supungsungihyan (SPSGH) in db/db Mouse

Sung Hyun LEE¹, Se Young AN¹, Ho Kyung DU¹ and Sung Hyun CHUNG

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

(Received November 23, 1999; accepted December 16, 1999)

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

Keywords □ Supungsungihyan (SPSGH), db/db mouse, Glycated hemoglobin, Triglyceride, Insulin, Glycosidase, Glucose transporter, RT-PCR

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

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

인류 문명의 발달에 따른 식이형태와 생활양식의 변화로 인해 비만 인구와 함께 증가추세에 있는 인슐린 非依存型 당뇨병 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM, type 2)은 인슐린의 분비가 절대적으로 부족한 인슐린 依存型 당뇨병 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM, type 1)과는 달리 인슐린 저항성이 주요한 병태생리학적 특징이다. 인슐린 저항성은 유전적인 요인과 함께 말초조직

에서 인슐린 감수성을 감소시키는 식이형태나 비만, 운동 부족, 스트레스 등의 생활습관과도 밀접한 관련이 있는 병리상태로 근육과 지방조직내 조직 특이적 단백질인 葡萄糖輸送體 (glucose transporter, GLUT)의 결함도 주요한 원인으로 보고되고 있다 (Zeil 등, 1988; Jo 등, 1991).

당뇨병에 대한 東醫 方劑의 효능을 보고한 최근의 보고로 吳는 玉泉散을 (오 등, 1990), 李는 黃湯加味方을 (이, 1985), 金은 生津養血湯을 (김, 1994), 金은 加味地黃湯을 (김 등, 1992), 洪은 回春涼膈散을 (홍 등, 1991), 劉는 淸心蓮子飲과 玉女煎을 (류 등, 1990), 張은 加味四物湯을 (장, 1990), 李는 六味地黃湯을 (이, 1997) 검체로 하여 mouse의 혈당에 미치는 영향을 보았으나, 이들 연구가 대부분 제1형 당뇨병의 동물모델을 이용한 것으로 당뇨병 환자의 대부분을 차지하는 제2형 당뇨병에 대한 효능과 작용기전에 대해서는 연구가 미미하다. db/db mouse는 염색체 4번에 존재하는 diabetes gene (leptin receptor gene)의 돌연변이로 인해 多食, 점진적인 비만, 인슐린 저항성, 高혈압 血症, 고혈당 등 인슐린 非依存型 당뇨병과 유사한 임상적 특징을 가지므로 인슐린 저항성과 당뇨병에 대한 유전적

*To whom correspondence should be addressed.

분석을 가능하게 하는 유용한 동물모델로서, 특징적으로 생 후 3개월까지에는 高인슐린血症과 체중증가를 보이다가 이후에는 혈액중 인슐린 농도가 점진적으로 감소하여 심한 인슐린 결핍증이 초래되는 것으로 보고되고 있다.

이에 본 연구에서는 醫學入門에 기재된 搜風順氣丸이 db/db mouse의 당대사에 미치는 영향 및 기전을 규명하고자 본 실험을 실시하였다.

실험방법

시료

실험에 사용한 약재는 시중에서 구입, 정선하여 사용하였으며, 方劑는 醫學入門에 기재된 搜風順氣丸으로 方劑의 구성약물과 1貼 분량은 Table I과 같다.

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

시약

Glucose, maltose, sucrose, PIPES, Trinder kit, GPO-

Trinder kit, glycated hemoglobin HbA₁ kit, Tris, Mg-Cl₂, CaCl₂, BSA, spermidine, DTT, DEPC, Triton X-100 등은 Sigma사, AMV reverse transcriptase, DNase, recombinant RNase inhibitor(rRNasin), random primers, dNTP, rNTP, T7 RNA polymerase 등은 Pro-mega사, RNA extraction kit는 Ambion사, Taq DNA polymerase는 Boeringer Maennheim사, 인슐린 radio-immunoassay kit는 EIKEN사, Bradford 시약(Coomassie-Brilliant Blue G-250 dye)은 Bio-Rad사, [α -³²P]CTP는 Amersham사에서 구입하였으며, 그외 시약은 시판 특급 혹은 일급시약을 사용하였다. PCR sense 및 antisense primer는 Bioneer사에 주문하여 사용하였다.

실험기기

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

실험동물 및 식이

7주령의 음성 C57BL/KsJ db/db 마우스(Jackson Laboratory, USA)를 3군으로 나누어 증류수 투여군을 db/db 대조군, 수풍순기환 물추출물 투여군을 SPSGH군, acarbose (5 mg/kg) 투여군을 acarbose군으로 설정하였고 한편 정상 대조군으로는 7주령의 음성 C57BL/KsJ +/+ 마우스를 사용하였으며 이들을 lean군으로 명명하였다. 약물 투여기간은 8 주령에서 12주령까지 4주간으로 수풍순기환의 경우 증류수에 임상용량(60 ml 추출액을 60 kg 성인의 1일 복용량으로 정하고, 이를 체중 25~30 g인 mouse에 대비하여 계산한 것) 10배의 시료를 용해시켜 음용수로 공급하였고 삼양사의 마우스 사료로 항온 항습 동물사육장에서 사육하였다.

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

시료 채취 및 처리 방법

공복시의 체중 및 혈액 채취는 13시간 (PM 9:00-AM 10:00) 절식시킨 후 오전 10시에 실시하였고, 비공복시의 체중 측정 및 혈액 채취는 오후 2시에 실시하였다.

Table I. Crude drugs and their amount constituted in Supung-sungihyan

藥物名	生藥名	學名	重 量 (g)
車前子	Plantaginis Semen	<i>Plantago asiatica</i> <i>Decaisue</i>	3.750
郁李仁	Pruni japonica Semen	<i>Prunus ishidozana Nakai</i>	3.750
檳榔	Arecae Semen	<i>Arecacatechu Lenne</i>	3.750
麻子仁	Cannabis Semen	<i>Cannabis Sativus Linne</i>	3.750
菟絲子	Cuscutae Semen	<i>Cuscuta australis R.</i> <i>Brown</i>	3.750
牛膝	Achyranthis Radix	<i>Achyranthes japonica</i> <i>Nakai</i>	3.750
山藥	Dioscorea Radix	<i>Dioscorea batatas</i> <i>Decaisne</i>	3.750
山藥萸	Corni Fructus	<i>Cornus officinalis sieb. et</i> <i>Zucc.</i>	3.750
枳殼	Ponciri Fructus	<i>Poncirus trifoliata</i> <i>Rofinesque</i>	1.875
防風	Ledebouriellae Radix	<i>Siler divaricatum Benth</i> <i>et Hooker</i>	1.875
獨活	Angelicae pubescensi Radix	<i>Aralia continentalis</i> <i>Kitagawa</i>	1.875
大黃	Rhei undulati Rhizoma	<i>Rheum officinale Baillon</i>	9.375
Total amount			45.0

혈액중 포도당 농도 측정을 위한 혈액은 미취 없이 안외정맥을 통해 채취한 후 5,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장을 사용하였다. 척추 분리법으로 마우스를 희생시킨 후 소장을 분취하여 -70°C 냉동고에 보관한 후 glycosidase 활성 측정을 위해 사용하였으며, 포도당수송체 유전자발현을 측정하기 위해 절제한 근육조직은 -70°C 냉동고에 보관한 후 RNA 분리시사용하였다.

생화학적 분석

1) 혈액중 포도당 농도 측정

안외정맥에서 얻은 혈액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 혈장내 포도당 농도를 glucose-oxidase 반응에 기초한 Trinder법(Trinder, 1969)으로 측정하였다.

2) 혈액중 인슐린 농도 측정

12주령 마우스의 안외정맥에서 얻은 혈액을 5,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장내 인슐린농도를 방사면역법(Johnstone과 Thorpe, 1987)으로 측정하였다.

3) 혈액중 당화 혈색소 농도 측정

12주의 마우스로부터 공복시의 혈액을 채취한 후 cation-exchange chromatography법(Schifreen 등, 1980)으로 측정하였다.

4) 혈액중 중성지방 농도 측정

12주의 마우스로부터 공복시의 혈액을 채취한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 혈장에서 중성지방을 McGowan 등의 방법이 변형된 변법(McGowan 등, 1983)을 사용하여 측정하였다.

5) 소장의 glycosidase 활성 검색

12주의 마우스에서 절취한 소장을 얼음 위에서 생리식염수로 세척하고 십이지장 부분을 같은 길이로 세 등분하여 각각을 proximal, middle, distal로 구분하여 각 부분별로 glycosidase 효소액을 제조하였다. 각 군별, 각 부분별 효소액을 기질과 반응시켜 glycosidase의 효소 활성을 측정하였고 이때 단백질량은 Bradford법(Bradford, 1976)으로 측정하여 단위 단백질당 glycosidase의 specific activity를 계산하였다. 소장의 glycosidase 효소액 제조와 활성 측정은 아래의 방법(Rhinehart 등, 1987)으로 실시하였다.

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

50 mM PIPES buffer (pH 6.8)에서 각 효소에 해당되는 이당류 (maltose, sucrose, lactose)를 기질로 하여 효소액과 함께 37°C 에서 30 분간 반응시켰다 (반응액중 최종 기질 농도 30 mM, 총 부피 200 μl). 효소반응 결과 유

리된 D-glucose는 Trinder법으로 측정하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)과 *in vitro* transcription

Glucose transporter mRNA의 정량은 internal standard와 함께 RT-PCR과 *in vitro* transcription 방법에 의해 실시하였다(Horikoshi 등, 1992). 각 조직으로부터 guanidine thiocyanate와 acid phenol extraction을 이용한 Chomczynski 등의 방법(Chomczynski와 Sacchi, 1987)으로 RNA를 분리하였다.

분리한 RNA를 DNase(DNase 50 unit, rRNasin 20 unit, 50 mM Tris(pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 2.5 μg BSA, 총 부피 50 μl)로 37°C 에서 60분간 처리하여 genomic DNA를 제거한 후, reverse transcription 반응(AMV reverse transcriptase 10 unit, 1 \times buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM KCl, 0.5 mM spermidine, 10 mM DTT), random primers 0.5 μg , 2.5 mM dNTPs, rRNasin 20 unit, 총 부피 50 μl)을 37°C 에서 60 분간 실시하여 cDNA를 합성하였다.

생성된 cDNA를 주형으로 하여 *Taq* DNA polymerase 2 unit, 1 \times buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100), 200 μM dNTPs, 12 pmole의 sense와 antisense primer (총 부피 50 μl)를 사용하여 GLUT-4 cDNA 일부분을 증폭하였다. 이때 PCR 조작 조건은 94°C 에서 30 초간 denaturation, 57°C 에서 30초간 annealing, 72°C 에서 30 초간 extension을 30회 반복하고 72°C 에서 5분간 post-incubation한 후 1% 한천 겔 전기영동을 통해 확인하였다.

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

증폭된 cDNA로부터 *in vitro* transcription 반응(T7 RNA polymerase 10 unit, 1 \times buffer (40 mM Tris(pH 7.9), 6 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 2 mM spermidine, 10 mM DTT), 0.5 mM rATP, rGTP, rUTP, 12 μM rCTP, rRNasin 10 unit, [α - ^{32}P]CTP, PCR product 3 μl , 총 부피 25 μl)을 37°C 에서 60분간 실시하여 *in vitro* transcript를 합성하였다. 이를 4.5% denaturated polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 겔을 건조한 후 자가 방사 기록하고 겔 상의 띠를 잘라 방사 계측하

였다.

통계처리

모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 program을 이용하였으며, 결과는 평균과 표준편차로 표시하였다. 수퐁순기환의 투여에 따른 영향 검증하기 위해 two way-ANOVA로 분석하였다. 각 군간의 유의성은 general linear model (GLM)의 Duncan's multiple test에 의해 비교하였으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

실험결과 및 고찰

식이 섭취량 및 체중의 변화

하루 평균 식이 섭취량은 lean, db/db 대조군, 수퐁순기환 투여군 (SPSGH), acarbose군의 순으로 각각 3.58, 6.94, 5.80, 6.27 g으로 시료 투여군에서 당뇨대조군에 비해 1.14 g 감소하였고 acarbose 투여군은 대조군에 비해 0.67 g 감소하였다.

4 주간의 시료 투여 후 체중의 변화를 살펴보면 lean, db/db 대조군, SPSGH, acarbose군의 순으로 각각 3.23, 7.76, 7.08, 8.30 g 증가하여 당뇨대조군에 비해 하루 식이 섭취량이 감소한 것에 비례하여 시료 투여군에서 체중이 감소된 경향을 나타내었지만 그룹간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. db/db 대조군은 lean 대조군에 비해 8 주에서 10 주까지 급격히 체중이 증가한 후 유지되는 경향을 나타낸 반면, 시료투여군은 전체 실험기간을 통해 서서히 점진적으로 증가하였다. 이 실험 결과 SPSGH는 대조군과 비교시 식욕을 억제시키고 결과 체중 증가폭이 완만해짐을 알 수 있었다.

포도당 농도

공복시 혈당은 db/db 대조군의 경우 체중의 변화와 같이 8 주에서 10주까지 급격한 증가 현상을 보였으며 10주에서 12 주까지는 유지되는 경향을 나타내었다. SPSGH 투여군에서는 시료 투여 2주째 혈당 강하 효과가 나타나기 시작하여 12주째 공복시 혈당은 lean, db/db 대조군, SPSGH, acarbose군의 순으로 107, 464, 345, 346 mg/dl로서 시료 투여군에서 대조군에 비해 119 mg/dl의 혈당 강하 효과가 나타나 acarbose와 비슷한 크기의 약효를 나타내었다.

비공복시 혈당은 lean, db/db 대조군 모두 실험기간 동안 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 SPSGH 투여군과 acarbose에서는 11주에 db/db 대조군과 비교시 유의한 혈당감소가 관찰되었다(lean, db 대조군, SPSGH 투여군, acarbose 투여군 순으로 126, 640, 577, 611 mg/dl).

인슐린 농도

본 실험에서 12주의 공복시 혈액중의 인슐린 농도를 측정한 결과 db/db 대조군은 lean 대조군에 비해 6배 정도 높은 인슐린 농도를 나타내었고 SPSGH 투여군은 db/db

Table II—Effects of SPSGH and acarbose on serum insulin level

Group	Serum insulin ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	
	12th	
Lean	26 \pm 11	
db/db	125 \pm 35	
SPSGH	155 \pm 46	
Acarbose	133 \pm 36	

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

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

대조군에 비하여 30 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 정도 높은 인슐린치를 나타낸 반면 acarbose군은 당뇨대조군과 거의 같은 수준의 인슐린치를 나타내었다(Table II). 이 결과 SPSGH는 당뇨쥐에서 약간의 인슐린분비 촉진 작용을 나타낸 것으로 사료되나 대조군과 비교시 유의적인 차이는 보이지 못하였다.

당화혈색소 농도

본 실험에서 시료 투여 마지막주에 당화혈색소 농도를 측정해본 결과 lean, db/db 대조군, SPSGH군, acarbose군의 순으로 각각 7.1 \pm 0.2, 11.4 \pm 1.0, 6.9 \pm 0.6, 10.8 \pm 0.9%로 SPSGH 투여군은 정상 대조군과 비슷한 수준의 당화혈색소치를 나타낸 반면 acarbose군은 당뇨대조군보다 약간 낮은 수준을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 1).

이는 시료투여군에서 공복시 혈당이 감소한 결과와도 일

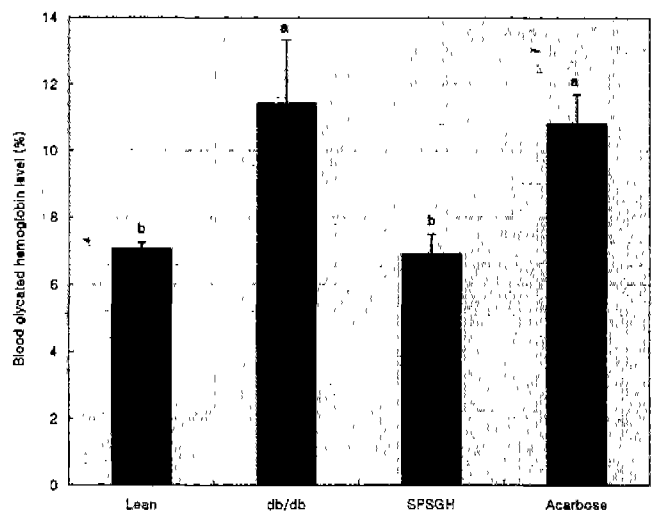


Fig. 1. Effects of SPSGH and acarbose on blood glycosylated hemoglobin level in db/db mice. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SPSGH, Supungsungihwan-administered group; Acarbose, acarbose-administered group. All data are mean \pm SE. Different alphabet means significantly difference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

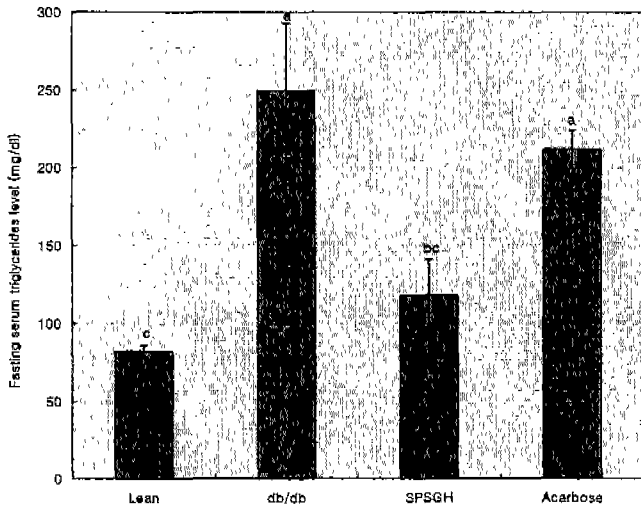


Fig. 2. Effects of SPSGH and acarbose on fasting serum triglyceride level in db/db mice. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SPSGH, Supungsungihwan-administered group; Acarbose, acarbose-administered group. All data are mean \pm SE. Different alphabet means significantly difference at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

치하는 것으로 지속적으로 혈당이 조절되었음을 시사하며 이러한 혈당조절활성은 향후 당뇨병증의 예방에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

중성지방 농도

본 실험에서 시료 투여 마지막주에 혈액 중 중성지방 농도를 측정해본 결과 lean, db/db 대조군, SPSGH, acarbose군의 순으로 각각 82 ± 4 , 249 ± 43 , 117 ± 23 , 211 ± 12 mg/ml로서 lean 대조군에 비해 db/db 대조군은 3배 이상 증가되었고, SPSGH 투여군은 db/db 대조군에 비해 51.8% 유의적으로 크게 감소함을 관찰하였다(Fig. 2).

이 결과로부터 SPSGH는 고지방혈증을 개선시키는 작용

이 탁월하다고 인정되며 그 이유는 인슐린저항성이 소실되어 생긴 결과가 아닌가 여겨진다.

소장의 glycosidase 활성

본 실험에서는 수풍순기환이 소장에서 당의 흡수를 저해하는 활성이 있는지 살펴보기 위하여 시료를 투여한 후 소장을 proximal, middle, distal의 같은 길이의 세 부분으로 나누어 각 구간내 이당류의 소화효소인 glycosidase 활성을 비교해 보았다.

Sucrase의 경우 db/db 대조군에서 lean 대조군보다 세 부분 모두 효소 활성이 유도되었고 (proximal 2배, middle 3배, distal 2.5배), 각 부분간 효소 활성의 크기는 proximal > middle > distal의 순이었다. SPSGH 투여군의 경우 sucrase 효소활성이 proximal에서는 증가한 반면 middle과 distal 부위에서는 대조군에 비해 감소하였다. 한편 acarbose 군의 경우 distal 부분만 제외하고 증가하는 경향이 관찰되었다(Table III). 시료 투여군의 경우 상대적으로 sucrase의 활성이 큰 proximal 부분에서는 대조군에 비해 큰 폭으로 증가된 반면, acarbose군은 proximal, middle 부분에서는 약간씩 증가하고 활성이 작은 distal 부분에서는 약간 감소하였다.

Maltase의 활성은 db/db 대조군이 lean 대조군보다 proximal, middle, distal 전부분에서 2 배 정도 활성이 증가되었고 sucrase와는 반대로 각 부분의 활성의 크기는 proximal < middle < distal의 순이었다. SPSGH 투여군에서는 sucrase의 경우와 마찬가지로 proximal 부분만 제외하고 당뇨대조군보다 감소하였다. Acarbose군의 경우는 세 부분에서 전반적으로 maltase 활성이 증가되었는데, 특히 distal 부분에서는 db/db 대조군보다 현저하게 증가하였다(Table IV).

Lactase 활성은 α -결합을 가진 탄수화물 소화 효소와는 달리 db/db 대조군과 비교시 SPSGH 및 acarbose 투여군

Table III—Effects of SPSGH and acarbose on intestinal sucrase activity

Group	Sucrase activity		
	Proximal	Middle	Distal
Lean	13.4	7.5	5.4
db/db	25.4	22.0	13.6
SPSGH	24.4	18.4	14.7
Acarbose	28.5	25.4	10.2

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

Table IV—Effects of SPSGH and acarbose on intestinal maltase activity

Group	Maltase activity		
	Proximal	Middle	Distal
Lean	228	239	238
db/db	374	396	478
SPSGH	579	173	341
Acarbose	424	408	763

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

Table V—Effects of SPSGH and acarbose on intestinal lactase activity

Group	Lactase activity		
	Proximal	Middle	Distal
Lean	2.93	2.49	1.36
db/db	3.57	3.41	2.96
SPSGH	3.26	3.61	1.55
Acarbose	3.81	3.91	1.85

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

에서 큰 차이를 나타내지 않았다(Table V).

그룹간 glycosidase 활성을 비교한 결과들을 종합해 보면, db 대조군은 lean 군에 비해 소장 전부분에 걸쳐 효소 활성이 유도되었다. 치료투여군의 경우 SPSGH군에서는 총 효소활성(proximal에서 distal까지 합친)이 db 대조군에 비해 sucrase, maltase, lactase 모두 활성이 약간씩 감소하였다. Sucrase의 경우 db 대조군과 SPSGH군의 총 효소활성은 61.0(단위는 nmoles of glucose produced/mg protein/min)에서 57.5로, maltase의 경우 1,248에서 1,093로, lactase의 경우 9.9에서 8.3으로 나타났다. 이 결과는 수풍순기환이 소장내 glycosidase 효소활성에는 크게 영향이 없

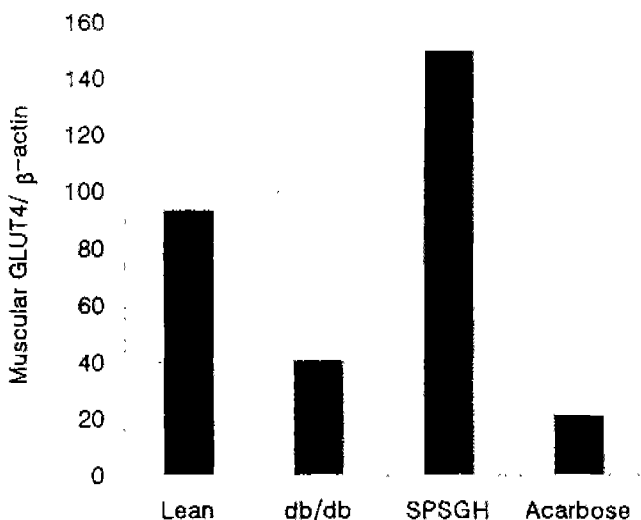


Fig. 3. Effects of SPSGH and acarbose on GLUT-4 mRNA expression in quadriceps muscle. Lean, normal group; db/db, diabetic control group; SPSGH, Supungsinhwan-administered group; Acarbose, acarbose-administered group.

음을 의미한다. 한편 acarbose군에서는 각 효소의 총 활성이 오히려 db 대조군에 비해 증가되는 경향을 보여주었다. 투여용량에서 glycosidase에 대한 강한 저해작용의 결과 보상적으로 효소 단백질의 발현이 증가된 것이 아닌가 추측된다.

근육조직에서 GLUT4 mRNA 발현에 대한 효과

본 실험에서는 SPSGH 추출물의 투여로 인한 근육조직의 GLUT4 mRNA 발현의 변화를 살펴봄으로써 말초 인슐린 저항성이 개선 혹은 악화되는지를 살펴보았다. db/db 대조군은 lean 대조군에 비해 GLUT4 mRNA양이 55.9% 감소하였으나 (muscular GLUT4 mRNA/β-actin mRNA, db/db 대조군; 41.5, lean 대조군; 94.1), SPSGH 추출물의 투여로 인해 GLUT4 mRNA양이 당뇨병대조군에 비해 현저하게 증가하였으며 오히려 lean 대조군보다 높은 수치를 나타내었다(muscular GLUT4 mRNA/β-actin mRNA, SPSGH 150.1, acarbose; 21.8, Fig. 3). 이 결과로부터 SPSGH 추출물의 투여는 GLUT4의 감소로 인해 인슐린 저항성이 발생되었을 때 GLUT4의 발현을 정상수준 혹은 그 이상으로 회복시킴으로서 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 SPSGH 추출물이 GLUT4 mRNA 발현에 직접적으로 영향을 미치는지 아니면 다른 기전에 의해 고혈당을 조절한 결과로 인한 간접적인 결과 인지를 규명할 계획이다.

결론

醫學入門에 기재된 搜風順氣丸을 db/db mouse에 4주간 투여한 후 얻은 결론은 다음과 같다.

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

둘째, 수풍순기환 투여군에서 근육조직내 포도당수송체인 GLUT-4의 발현이 증가한 것으로 보아 수풍순기환의 혈당강하기전은 포도당수송체의 증가에 따른 혈중포도당 유입의 증가로 인해 혈당치가 감소된 것으로 여겨진다.

감사의 말씀

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

참고문헌

金聖泰, 曹東鉉, 杜鎬京 (1992). 加味地黃湯이 Streptozotocin 投與 白鼠 血糖量에 미치는 영향, 경희한의대 논문집 15, 397-413.

- 金信錫 (1994). 高血糖 쥐의 胰臟 酵素活性에 미치는 生津 養血湯의 影響, 大韓東洋醫學會誌 **15**, 429-442.
- 劉東昊 外 (1990). 清心蓮子飲과 玉女煎이 Streptozotocin 投與로 誘發된 白鼠의 高血糖에 미치는 影響, 慶熙醫學 **6**, 500-503.
- 吳政錫 外 (1990). 玉泉散이 Alloxan 投與 白鼠 血清의 代謝基質에 미치는 影響, 서울, 東醫病理學會誌 **5**, 77-88.
- 李雄楨 (1985). 消渴에 應用되는 黃耆湯加味方이 KK mouse의 代謝機能에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院.
- 이철완 (1997). 熟地黃의 修治差異에 따른 六味地黃湯煎 湯液이 糖尿性 고지혈증에 미치는 影響, 대전대학교 대학원.
- 張世煥 (1990). 加味四物湯이 糖尿에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 박사학위논문, 大邱韓醫科大學 大學院.
- 洪鍾秀 外 (1991). 回春涼膈散이 Streptozotocin 投與 白鼠의 血糖量에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 **14**, 397-399.
- 許浚 (1994).: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p. 508.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chen, F., Nakashima, N., Kimura I. and Kimura, M. (1995). Hypoglycemic Activity and Mechanism of Extracts from Mulberry Leaves(Folium Mori) and Cortex Mori Radicis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice, Japan, 藥學雜誌 **115**(6), 476-482.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Dunn, F. L. (1990). Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diab. Metab. Rev.* **6**(1), 47-61.
- Garvey, W. T., Huecksteadt, T. P. and Birnbaum, M. J. (1989). Pretranslational suppression of an insulin-respon-sive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science* **245**, 60-63.
- Gibbs, E. M., Stock, J. L. and McCold, S. C. (1995). Glycemic Improvement in Diabetic db/db Mice by Over-expression of the Human Insulin-regulatable Glucose Transporter(GLUT-4). *J Clin Invest* **95**, 1512-1518.
- Hikino, H. and Oshima, Y. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of Moran A, a glycoprotein of Morus Alba root bark. *Planta Medica* **159**-160.
- Horikoshi, T., Daneberg, K. D., Stadlbauer, T. H. W., Volkenandt, M., Shea, L. C. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P. and Daneberg, P. V. (1992). Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* **52**, 108-116.
- Jo, H., Hardy, R. W. and McDonald, J. M. (1991). Regulation of Glucose Transport, *Diabetes* **15**, 1-4.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1987). Immunoassays in Immunochemistry in Practice 2nd., Blackwell Scientific Publications. London, pp. 246-254.
- Kissebah, A. H., Alfarsi, S., Evans, D. J. and Adams, P. W. (1992). Integrated regulation of very-low-density lipoprotein triglycerides and apolipoprotein B kinetic in NIDDM. *Diabetes* **31**, 217-225.
- McGowan, M. W., Artiss, J. D., Strandbergh, D. R. and Zak, B. (1983). A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* **29**, 538-542.
- Muekler, M., Caruso, C., Baldwin, S., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W., Lienhard, G. E., Lodish, H. F. (1985). Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter. *Science* **229**, 941-945.
- Nathan, D. M., Singer, D. E., Godine, J. E., Harrington, C. H. and Perlmutter, L. C. (1986). Retinopathy in older type II diabetes. *Diabetes* **35**, 797-801.
- Rhinehart, B. L., Robinson, K M., Liu, P. S., Payne, A. J., Whetley, M. E. and Wagner, S. R. (1987). Inhibition of intestinal disaccharidase and suppression of blood glucose by a new α -glycosidase inhibitor-MDL25,637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**(3), 915-920.
- Schifreen, R. S., Hickingbotham, J. M. and Bowers, G. N. (1980). Accuracy, precision, and stability in measurement of hemoglobin A_{1c} by "high performance" cation-exchange chromatography. *Clin. Chem.* **26**, 466-472.
- Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using 4-aminophenazone as an oxygen acceptor. *J. Clin. Pathol* **22**(2), 246.
- Weigle, D. S. and Kuijper, J. L. (1997). Mouse models of human obesity. *Science & Medicine*, May/June, 38-40.
- Zeil, F. H., Venkatesan, N. and Davidson, M. B. (1988). Glucose transport is rate limiting for skeletal muscle glucose metabolism in normal and STZ-induced diabetes rats. *Diabetes* **37**, 885-890.
- Zhou, Y. P., Berggren, P. O. and Grill, V. (1996). A Fatty Acid-Induced Decrease in Pyruvate Dehydrogenase Activity Is an Important Determinant of β -Cell Dysfunction in the obese Diabetic db/db Mouse, *Diabetes* **45**(5), 580-586.