돌콩추출물의 *db/db* 비만마우스에서의 항당뇨효능 연구

최정준

대전대학교 한의과대학 분자의학실험실

Anti-Diabetic Effects of *Glycine soja* Extract in Genetic Animal Model of *db/db* Mouse

Jeong June Choi

Laboratory of Molecular Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

Received: November 21, 2016

Revised: November 28, 2016

Accepted: November 29, 2016

Correspondence to: Jeong June Choi
Laboratory of Molecular Medicine,
College of Korean Medicine, Daejeon
University, 62 Daehak-ro, Dong-gu,
Daejeon 34520, Korea
Tel: +82-42-280-2648
Fax: +82-42-274-2600
E-mail: c27022@du.ac.kr

Copyright © 2016 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: This study is aim to investigate the anti-diabetic effects of *Glycine soja* Siebold et Zucc. (GS) in diabetic mellitus animal model.

Methods: Male BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/db} mice (*db/db* mice) randomly assigned to 3 groups and treated with saline, metformin (150 mg/kg/day, positive control), and GS extract (2 g/kg/day). Body weight, food intake, and fasting blood glucose were monitored every week. After a consecutive 6-week treatment, the levels of lipid metabolites and insulin in plasma were measured with biochemistry analyzer.

Results: As well as fasting blood glucose and food intake, the levels of triglyceride, total cholesterol, and low-density lipoprotein in plasma were also dramatically decreased in GS group. Also, GS extract administration decreased the total fat mass. However, GS extract could not change the level of high-density lipoprotein and insulin. Furthermore, there was no difference in body weight between control and GS extract-treated group.

Conclusions: GS may have a potential to ameliorate diabetes mellitus by improving fasting blood glucose level and lipid metabolites. Further studies are warranted to investigate the underlying molecular mechanism of GS.

Key Words: Legumes, Diabetes mellitus, Blood glucose, Lipoprotein, Soybeans

서 론

당뇨는 인슐린의 분비가 부적절하게 이루어지거나 인슐린에 대한 반응성이 감소하면서 혈액의 당의 농도가 증가하며 나타나는 생리적 기능이상을 지칭하는 질병이다¹⁾. 한의학적으로는 多飲, 多尿, 多食의 증상을 나타내는 消渴의 범주로 구분하고 있다²⁾. 당뇨는 언급된 증상과 더불어 肥滿과 함께 발생하는 병으로 기름지고 단 음식을 많이 섭취함으로써 비만이 발생하고 이로 인해 체내에 熱이 축적되어 消渴이 발생하는 것으로 오래 전부터 이해되어 왔다³⁾.

현재 당뇨병 동물모델로 사용되고 있는 BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/db} 생쥐는 렙틴(leptin) 수용체에 발생한 유전적 변이

로 인해 스스로 당뇨병의 증상이 발생한다. 유전적 변이가 *db* 유전자에 발생하여 *db/db* 생쥐로도 명명되고 있다. 이 동물모델은 렙틴 수용체에 대한 반응이 소실되어 생후 4주부터 비만증이 발생하며 5주차부터는 혈액내 당농도가 300 mg/dl 이상으로 유지되는 고혈당이 발생한다. 반면 인슐린에 대한 반응성이 낮아지면서 인슐린의 농도는 높게 유지되는 특성이 있다⁴⁾. 렙틴에 유전자 돌연변이가 발생한 *ob/ob* 생쥐도 비만증, 고인슐린혈증이 발생하며 혈당의 수치도 상승되어 있어 당뇨병 또는 비만에 대한 동물모델로 널리 사용되고 있다⁵⁾. 이외에도 스트렙토조토신(streptozotocin)을 투여하여 췌장의 베타세포만을 선택적으로 파괴하여 당뇨를 발병시킨 동물모델도 질환연구에 많이 활용되고 있다⁶⁾.

C57BL/6 생쥐에 고지방식을 공급하는 diet induced obese 모델도 비만과 함께 당뇨 지표들이 표현되어 대사관련 질병연구에 이용되고 있다⁷⁾.

돌콩은 콩과에 속하는 덩굴성 1년초로 학명은 *Glycine soja* Siebold et Zucc.이고 생약명으로는 야대두등(野大豆藤), 대두등(野料豆)이라고도 불린다. 돌콩은 현재 식용으로 널리 사용되고 있는 대두(*Glycine max* L. Merr.)의 원조라고 여겨지고 있다⁸⁾. 야생에서 자생하고 있는 돌콩은 유전적 원형으로 인해 대두의 유전적 다양성을 증진시키기 위한 연구 재료로 사용되고 있다⁹⁾. 대두, 쥐눈이콩(*Rhynchosia volubilis*), 팔(*Vigna angularis*) 등 콩과류를 섭취하면 당뇨병 발생 시 인슐린 감수성을 강화하여 혈당을 강하하는 효능이 있다는 것이 잘 연구되어 있다¹⁰⁻¹²⁾. 돌콩도 다른 콩류와 마찬가지로 정상의 랫트에서 혈당과 총콜레스테롤의 양을 낮출 수 있는 보고는 있었으나¹³⁾ 당뇨병이 유발된 상황에서 효능이 있는가에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

본 논문은 돌콩으로부터 분리한 추출물이 나타내는 항당뇨 효능을 평가하고자 하였다. 이에 당뇨병 동물모델인 *db/db* 생쥐에 매일 2회씩 돌콩추출물을 경구투여하면서 1주일 간격으로 체중과 혈당의 변화를 관찰하였으며 6주 동안의 약물투여 후 혈액에 나타난 지질관련 생화학적 지표들과 인슐린의 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 돌콩추출물 제조

돌콩추출물은 KOC Biotech (Daejeon, Korea)에서 다음과 같이 제조한 것을 생리식염수에 현탁하여 사용하였다. 경상북도 문경시 우지동에서 자생하는 돌콩의 열매부위 (Semen glycines soja)를 채집하여 자연상태에서 10일간 건조시킨 뒤 믹서기로 파쇄하여 분말로 만들었다. 돌콩분말 1 kg에 증류수 1 L를 넣고 60°C에서 4시간 동안 추출한 다음 여과종이(No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 용액만을 여과하였다. 여과된 용액은 Rotary evaporator (Buchi, Essen, Germany)로 45°C에서 감압농축을 한 뒤 동결건조하여 130 g의 분말을 수득하였다(수득률 13%). 건조분말은 실험에 사용할 때까지 -80°C에서 냉동보관하였다.

2. 실험동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 3주령 수컷 BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/J} 생쥐(19~22 g)를 구입하여 실험 시작하기 앞서 1주일간 적응시켰다. 적응기간 동안 일반적인 행동 이상여부를 관찰하여 이상이 관찰되는 동물은 실험에 사용하지 않았다. 실험동물군은 각 6마리씩 대조군(Con), 양성대조군(Met), 실험군(GS)으로 나누었다. 메트포민(metformin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 150 mg/kg/day로 투여하였으며 돌콩추출물은 2 g/kg/day의 용량으로 투여하였다. 약물의 투여는 매일 오전 10시와 오후 4시에 이루어졌으며 1일 투여용량의 절반용량을 0.2 ml에 현탁하여 모두 경구투여하였다. 대조군은 생리식염수를 실험군과 동일한 부피로 경구투여하였다. 시료의 투여는 6주 동안 매일 실시하였다. 사육환경은 12:12시간씩 밤낮 주기를 주었으며 실내온도는 23°C±1°C, 습도는 45%±11%로 유지시켰다. 실험동물이 사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다. 동물 실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(DJUAR2011-005).

3. 혈당, 체중 식이섭취량 측정

실험동물의 혈당은 주 1회씩 매주 수요일에 측정하였다. 절식을 위해 오전 9시에 사료를 케이지에서 제거하고 6시간 동안 공복을 시켰다. 오후 3시에 *db/db* 생쥐의 꼬리 미정맥을 칼로 절단하여 혈액을 얻은 뒤 곧장 휴대용 혈당계(OneTOUCH@Ultra; Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA)로 측정하였다. 실험동물의 체중은 생후 4주령 때부터 매우 수요일 오전 9시에 측정하였다. 마지막 체중은 동물을 치사하기 직전에 저울로 측정하였다. 총체중증가량은 마지막에 측정한 체중에서 4주령의 체중을 빼서 계산하였다. 1일 평균 체중 증가는 총체중증가량을 실험기간인 6주(42일)로 나누어 계산하였다. 총식이섭취량은 매주 수요일 오전 9시에 케이지에 남아 있는 사료의 양을 측정하여 1주일 전에 넣어준 사료량과 비교하여 계산하였다. 1일 평균 식이 섭취량은 총식이섭취량을 6주(42일)로 나누어 계산하였다. 식이효율(feed efficiency ratio)은 총체중증가량을 총식이섭취량으로 나누어준 뒤 100을 곱하여 계산하였다.

4. 혈장분리

실험종료 전날 케이지에서 사료를 제거하고 16시간 동안 *db/db* 생쥐를 절식한 뒤 다음날 오전에 실험동물들을 안락사시켰다. 안락사를 위해 실험용 에테르를 이용하여 실험동물을 흡입마취하고 21 게이지 바늘크기를 가지는 3 ml 주사기를 사용하여 심장채혈을 통해 혈액을 적출하여 치사하였다. 적출된 혈액은 즉시 ethylenediaminetetraacetic acid 진공 튜브에 넣고 교반하여 혈액의 응고를 방지시켰다. 이후 4°C에서 3,000 rpm으로 15분동안 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 혈장을 분리하였다. 확보한 혈장은 실험에 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

5. 혈중 지질생화학 및 인슐린 분석

혈장에 존재하는 중성지방(triglyceride), 총콜레스테롤(total cholesterol), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)는 생화학자동분석기(Hitachi-720; Hitachi Medical, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 혈장에 존재하는 인슐린의 양은 마우스 인슐린 ELISA 키트(Shibayagi, Shibukawa, Japan)를 이용하여 제조사의 프로토콜을 따라 실험하였으며 microplate reader (Labsystems, Vantaa, Finland)로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

6. 총지방중량 측정

안락사시킨 실험동물의 복부를 절개하여 복부(abdominal), 부고환(epididymal), 사타구니(inguinal)에 분포하고 있는 지방조직을 부위별로 따로 적출하여 무게를 측정한 뒤 각 실험동물 개체별로 총지방중량을 산출하였다.

7. 통계분석

결과 분석은 IBM SPSS ver. 21 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하였으며 실험 결과는 mean $\pm$ standard error of mean으로 표현하였다. 다중 비교는 일원배치분산분석(ANOVA)을 사용하였으며 사후 분석은 Tukey's test로 검정하였다. $P < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 돌콩추출물이 체중과 식이에 미치는 영향

돌콩추출물을 Sprague-Dawley 랫트에 경구투여하여 급성독성평가를 진행한 결과 최고농도인 5 g/kg까지 전혀 독성이 나타나지 않았다(data not shown: $n=5$ /group). 이에 *db/db* 생쥐에서 항당뇨 효능을 평가하기 위하여 돌콩추출물을 2 g/kg/day로 투여하였다. 그 결과, 생리식염수를 투여한 대조군은 체중이 25.0 ± 0.75 g이었으며 돌콩추출물을 투여한 실험동물은 25.1 ± 1.42 g으로 체중변화에 차이가 없었다. 또한 돌콩추출물을 6주 동안 투여하면서 1주일 간격으로 실험동물의 체중을 측정된 결과 실험기간 동안 돌콩추출물을 처리한 실험군과 대조군 사이에 유의적인 체중의 차이를 관찰하지 못했다(Fig. 1).

전체 실험기간 동안 대조군 그룹에서는 1마리당 하루에 평균적으로 5.07 g의 사료를 섭취한 반면 돌콩추출물을 투여한 그룹의 생쥐는 평균적으로 4.48 g의 사료를 섭취하여 대조군에 비해 섭취한 사료의 양이 감소하였다. 그러나 통계적으로 유의적이지 않았다. 메트포민을 투여한 양성대조군의 그룹도 1마리가 평균적으로 하루에 섭취한 사료의 양이 4.78 g으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의적이지 않았다(Table 1). 한편 식이를 통해 섭취한 영양원이 체중에 미치는 효능을 알아보고자 6주 동안 증가한 전체 체중과 섭취한 사료의 무게를 비교하여 feed efficiency ratio를 산출한 결과 대조군은 그 값이 7.4%였으며 돌콩추출물을 투여

Fig. 1. Changes of body weight in BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/j} diabetic mice. The mice were orally administered with GS (2 g/kg/day, twice in a day) and Met (150 mg/kg/day, twice in a day) for 6 weeks. The body weight was measured in every week. The data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean ($n=6$ /group). Con: control group, Met: metformin-treated group, GS: *Glycine soja* Siebold et Zucc. extract-treated group.

한 실험군은 7.8%로 거의 차이가 나지 않았다. 반면 메트포민을 투여한 양성대조군은 9.4%로 그 값이 대조군에 비해 증가하였다(Table 1).

2. 돌콩추출물이 혈당에 미치는 영향

돌콩추출물이 혈당에 미치는 영향을 알아보기 위해 매주 1회 실험동물의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈중 당농도를 측정하였다. 대조군 *db/db* 생쥐의 혈액에 존재하는 당의 농도는 실험시작일에 155.8 ± 7.0 mg/dl였으나 6주 후에 545.8 ± 20.5 mg/dl까지 올라가 혈당이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 돌콩추출물을 투여한 그룹은 5주째부터 혈당이 유의적으로 감소하여(481.8 ± 28.9

vs. 367.3 ± 19.5 mg/dl, $P < 0.01$) 6주째에는 대조군에 비해 혈당의 양이 8.2% 낮게 나타났다($P < 0.01$). 메트포민은 투여 후 2주째부터 유의적으로 혈당의 양이 감소한 것을 볼 수 있었다.

3. 돌콩추출물이 간기능에 미치는 영향

돌콩추출물이 실험동물의 간에 미치는 영향을 알아보기 위해 6주 동안 추출물을 경구투여한 뒤 혈장에 존재하는 ALT와 AST의 양을 측정하였다. 그 결과 돌콩추출물을 6주간 투여한 실험동물의 혈장에 존재하는 ALT(Fig. 3A)와 AST(Fig. 3B)의 양은 대조군과 비교하여 통계적으로 차이가 나타나지 않았다.

4. 돌콩추출물이 혈중지질에 미치는 영향

돌콩추출물이 혈장 내 지질의 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 중성지방, 총콜레스테롤, LDL, HDL의 양을 측정하였다. 돌콩추출물을 6주 동안 투여한 결과 대조군에 비해 혈장 내의 중성지방 양은 21% ($P < 0.05$; Fig. 4A), 총콜레스테

Table 1. The Effects of GS Extract on Feed Efficiency Ratio

Variable	Con	Met	GS
Initial body weight (g)	25.0 ± 0.75	23.7 ± 0.61	25.1 ± 1.42
Final body weight (g)	41.1 ± 0.41	42.6 ± 0.33	39.8 ± 1.01
Average daily gains (g)	0.38	0.45	0.35
Average daily food intake (g)	5.07	4.78	4.48
Feed efficiency ratio (%)	7.4	9.4	7.8

The mice were orally administered with GS (2 g/kg/day, twice in a day) and Met (150 mg/kg/day, twice in a day) for 6 weeks. The values of initial body weight and final body weight are expressed as mean $\pm$ standard error of mean ($n=6$ /group). The values of average daily gains and average daily food intake are expressed as mean of 6 mice. Feed efficiency ratio (%) is calculated by dividing value of total food intake by that of total body weight gains. Con: control group, Met: metformin-treated group, GS: *Glycine soja* Siebold et Zucc. extract-treated group.

Fig. 2. The effect of GS on the blood level of glucose in BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr $^{db/db}$ diabetic mice. The mice were orally administered with GS (2 g/kg/day, twice in a day) and Met (150 mg/kg/day, twice in a day) for 6 weeks. The level of glucose was measured with blood from mice tail under 6 hours fasting in every week. The data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean ($n=6$ /group). Con: control group, Met: metformin-treated group, GS: *Glycine soja* Siebold et Zucc. extract-treated group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Con.

Fig. 3. The effect of GS on the plasma levels of ALT and AST in BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr $^{db/db}$ diabetic mice. The mice were orally administered with GS (2 g/kg/day, twice in a day) and Met (150 mg/kg/day, twice in a day) for 6 weeks and the levels of (A) ALT and (B) AST in plasma were measured. The data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean ($n=6$ /group). ALT: alanine transaminase, AST: aspartate aminotransferase, Con: control group, Met: metformin-treated group, GS: *Glycine soja* Siebold et Zucc. extract-treated group. ** $P < 0.01$ vs. Con.

롤의 양은 27% ($P<0.01$; Fig. 4B), LDL의 양은 46% ($P<0.05$; Fig. 4C) 감소한 것으로 나타났다. 그러나 HDL의 양은 대조군에 비해 유의적인 변화가 나타나지 않았다 (69.7 ± 4.7 mg/dl vs. 65.30 ± 2.7 mg/dl; Fig. 4D).

5. 돌콩추출물이 혈중 인슐린발현에 미치는 영향

돌콩추출물이 인슐린의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6주 동안 돌콩추출물 또는 메트포민을 투여한 db/db 생쥐의 혈장에 존재하는 인슐린의 양을 측정하였다. 사료를 16시간 동안 제거한 뒤 공복상태의 실험동물로부터 얻은 혈장에 존재하는 인슐린의 양을 측정한 결과 대조군에서는 인슐린의 양이 5.72 ± 1.12 ng/ml였으나 돌콩추출물을 투여한 군에서는 4.81 ± 0.30 ng/ml이 검출되어 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5A). 양성대조군으로 사용한 메트포민 투여군도 5.23 ± 0.81 ng/ml의 인슐린이 검출되어 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

6. 돌콩추출물이 지방에 미치는 영향

돌콩추출물이 db/db 생쥐의 지방축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6개월 동안 돌콩추출물을 투여한 실험동물의 복부, 부고환, 사타구니에서 지방을 부위별로 적출한 뒤 총 지방의 무게를 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 돌콩추출물을 투여한 실험군에서 지방의 축적이 유의적으로 11% 감소하는 것을 관찰할 수 있었다($P<0.05$). 반면 메트포민

을 투여한 실험동물군은 5% 정도의 무게 감소가 있었으나 통계적으로 유의적이지 않았다(Fig. 5B).

Fig. 5. The effects of GS extract on insulin level and total fat weight in BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/db} diabetic mice. The mice were orally administered with GS (2 g/kg/day, twice in a day) and Met (150 mg/kg/day, twice in a day) for 6 weeks. (A) The level of insulin in plasma was measured. (B) The total fat mass from each mouse was calculated by aggregated with the fats from abdomen, epididymis, and groin. The data are expressed as mean±standard error of mean (n=6/group). Con: control group, Met: metformin-treated group, GS: *Glycine soja* Siebold et Zucc. extract-treated group. * $P<0.05$ vs. Con group.

Fig. 4. The effects of GS on plasma biochemical markers related to metabolic syndrome in BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/db} diabetic mice. The mice were orally administered with GS (2 g/kg/day, twice in a day) and Met (150 mg/kg/day, twice in a day) for 6 weeks. The levels of (A) triglyceride, (B) total cholesterol, (C) LDL, and (D) HDL in plasma were measured. The data are expressed as mean±standard error of mean (n=6/group). LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, Con: control group, Met: metformin-treated group, GS: *Glycine soja* Siebold et Zucc. extract-treated group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Con group.

고찰 및 결론

당뇨병은 혈액내 포도당의 조절이 실패하면서 나타나는 대사성질환으로 포도당이 혈액 내에 고농도로 존재하면서 목마름, 다뇨, 피로감이 나타나며 인슐린의 작용이 저하되면서 세포들이 포도당을 이용하기 힘든 상태가 된다. 이에 축적되어 있던 체지방이 에너지원으로 사용되면서 결국은 체중이 감소하는 현상이 나타나게 된다. 당뇨병은 췌장의 베타세포가 인슐린을 적절하게 분비하지 못하여 나타나는 1형 당뇨병과 일정 수준의 인슐린 분비 저하나 인슐린에 대한 감수성이 감소하여 신체적 상태가 상대적으로 인슐린이 부족하게 느끼는 2형 당뇨병으로 크게 구분지을 수 있다. 이 중 2형 당뇨병 환자들이 전체 당뇨병의 90% 이상 대다수를 차지하고 있다¹⁾. 2형 당뇨병의 경우 인슐린에 대한 세포들의 반응성이 낮아져 혈중 포도당 농도가 증가함과 동시에 췌장에서 반응을 나타낼 수 있을 만큼 충분한 양의 인슐린을 만들지 못하거나 저항성을 가지게 된 상태로 정의하고 있다¹⁴⁾. 당뇨병의 심각성은 다른 합병증을 유발하는 데 있다. 케톤산증, 당뇨병성 혼수와 같은 급성 합병증은 물론이고 당뇨병성 망막증, 당뇨병성腎症, 당뇨병성 神經症, 요독증, 심근경색, 협심증 등 치명적인 만성 합병증을 동반하게 되므로 당뇨병은 적절히 치료되어야 한다¹⁵⁾.

돌콩은 항산화 효능을 가지고 있으며 암세포의 성장을 억제하는 효능이 있다고 보고되었다. 돌콩의 베타올 분획물이 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 세포독성을 나타내었으며 항산화 효능이 있었다¹⁶⁾. 이러한 항산화 효능은 돌콩에 포함된 (-)-epicatechin에 의해 나타나는 것으로 여겨진다¹⁷⁾. 또한 페놀계 물질인 p-hydroxybenzoat이 돌콩에서 존재하는데 이것은 in vitro에서 암세포의 성장을 억제하는 효능을 나타냈다¹⁸⁾. 돌콩에서 분리된 glysojanin 단백질이 곰팡이의 성장을 억제하는 항균효능을 가지고 있음이 보고되었다¹⁹⁾. 이외에도 돌콩에서 다양한 종류의 사포닌 성분이 관찰되어²⁰⁾ 돌콩이 다양한 생리활성의 효능을 가지고 있음이 확인되고 있다. 돌콩에 포함된 항산화물질인 (-)-epicatechin과 사포닌의 경우 당뇨에 효능이 있는 물질로 알려져 있다. 인삼에서 추출된 사포닌은 중성지방과 혈당을 낮추고 인슐린의 분비를 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다²¹⁾. 정제된 (-)-epicatechin을 당뇨가 유발된 실험동물에 투여 시 혈당

을 낮추는 항당뇨효능이 있으며 알록산(alloxan)에 의해 파괴되는 췌장의 베타세포를 재생시키는 효능이 있다고 보고되었다²²⁾. 그러나 아직까지 돌콩에서 추출된 (-)-epicatechin과 사포닌이 당뇨에 효능을 나타낸다는 연구결과는 없으며 본 연구에서도 항당뇨효능의 유효성분은 정확히 밝혀지지 않아 앞으로 관련 연구가 필요하다.

본 연구를 통해 돌콩추출물이 혈당을 조절하는 효능이 있음을 보여주었다. 돌콩추출물이 혈액 내 당의 농도를 조절하는 것으로 나타난 시기는 약물 투여 후 5주째였다(Fig. 2). 약물투여 후 3주부터 혈당이 돌콩추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비해 낮아지는 것이 관찰되었으나 그 수준이 통계적으로 유의적이지 않았다. 반면 양성대조군으로 사용한 메트포민은 약물 투여 후 2주만에 유의적으로 실험동물에서 혈당을 강하하는 작용이 나타났다. 메트포민은 바이구아나이드(biguanides)의 경구용 당뇨병치료제로 adenosine monophosphate-activated protein kinase를 활성화하여 포도당이 형성되는 것을 억제하는 반면 인슐린에 대한 저항성을 개선하며 세포가 포도당을 흡수하는 것을 도와 혈당을 낮추는 역할을 한다²³⁾. 그러나 메트포민은 설사, 오심, 구토, 식욕부진 등 위장관에 대한 부작용이 강하게 나타나고 유산혈증(lactic acidosis)이 발생한다고 보고되어 있다²⁴⁾. 이와 달리 식용으로 사용 가능한 돌콩추출물의 경우 메트포민에 비해 매우 안전한 것으로 여겨진다. 본 연구가 진행되는 6주 동안 돌콩추출물을 투여한 실험동물에서 이상반응이 관찰되지 않았으며 부검 시에도 독성반응이 나타나지 않았다. 또한 간손상의 지표로 사용되고 있는 ALT와 AST의 혈중 농도도 돌콩추출물을 투여한 그룹에서 대조군에 비해 전혀 증가하지 않아 간독성이 없는 것으로 여겨진다(Fig. 3). 약물을 장기간 투여해야 하는 질병의 특성을 고려한다면 당뇨병 치료제는 부작용이 최소화되어야 함은 물론이고 안전성을 갖추는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 향후 돌콩추출물에 대한 추가적인 연구를 진행하여 안전성을 확보하게 된다면 당뇨를 치료할 수 있는 소재로 개발할 수 있는 가능성이 있을 것이다.

돌콩은 공복혈당을 낮출 뿐만 아니라 혈중 지질의 농도도 낮추는 효능을 가지고 있는 것으로 판단된다. 돌콩은 LDL의 농도를 크게 개선하며 중성지방의 혈중 농도도 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 지질지표들의 개

선은 당뇨병 환자에게서 쉽게 발생할 수 있는 심혈관계 질환을 크게 개선할 수 있다는 점에서 중요하다. 특히 당뇨병 환자의 치료지침에 의하면 LDL뿐만 아니라 중성지방의 양도 낮추고 HDL의 양은 증가시키는 것을 목표로 하고 있다²⁵⁾. 혈중 지질 지표뿐만 아니라 돌콩은 지방의 축적을 억제시키는 효능도 가지고 있는 것으로 보여진다(Fig. 5B). 그러나 이것이 체중의 감소로 연결되지는 않았다(Fig. 1). 돌콩추출물을 6주 투여한 실험군과 대조군의 체중차이는 1.3 g이었으며 총지방량 차이는 0.6 g이었다. 총지방량은 돌콩추출물이 투여된 실험동물에서 통계적으로 유의성이 관측되었으나 이는 총지방량 자체의 양이 적어 유의성을 나타낸 것으로 보여진다. 결과를 종합하면 비록 돌콩추출물이 체내에 축적되는 지방의 양을 줄이기는 하였으나 이를 통해 체중을 조절하는 효능은 제한적이라고 보여진다.

본 연구는 돌콩이 BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db/J} 생쥐에서 혈당과 혈장의 지질생화학 지표를 개선하는 데 효과적임을 보여주었다. 그러나 체중과 혈중 인슐린 및 HDL의 농도에는 영향을 주지 않았다. 이 결과들을 종합하면 돌콩은 인슐린의 분비보다는 인슐린에 대한 저항성을 개선하여 혈당을 조절하는 것으로 여겨진다. 대부분의 인슐린 환자들이 인슐린 저항성에 의해 나타나는 2형 당뇨병 환자임을 감안하면 돌콩의 약리 효능을 활용할 수 있는 가능성이 있다고 여겨진다. 이에 돌콩을 당뇨 환자의 식이요법에 사용하는 식품으로 활용하거나 당뇨병 치료제에 대한 보조제로 활용할 수 있을 것으로 예상되며 항당뇨 유효성분을 규명한다면 의약품으로 개발할 수 있는 길을 제시할 수 있을 것으로 보여진다. 그러나 이를 위해서는 당화혈색소(HbA1c) 또는 oral glucose tolerance test 등 돌콩이 나타내는 항당뇨 작용에 대한 추가적인 연구는 반드시 필요하며 향후 혈당을 조절하는 작용기전과 그 유효성분을 밝히는 연구들을 수행해야 할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 산학연협력기술개발사업의 일환으로 수행하였음(C03953360100447705, 첫걸음-돌콩 유래 당뇨 및 당뇨합병증 예방 및 개선용 기능성 소재 개발).

References

1. World Health Organization (WHO). Diabetes Fact Sheet [Internet]. Geneva : WHO; [cited 2016 Nov 20]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
2. Doo HK. Clinical kidney system research. Seoul : Seongsosa. 1995 : 552-8.
3. Kwon KH. Hwang-je-nae-kyeong. Seoul : Banryong. 2000 : 77, 120.
4. Kanasaki K, Koya D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. J Biomed Biotechnol. 2011 ; 2011 : 197636.
5. Lindstrom P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. ScientificWorldJournal. 2007 ; 7 : 666-85.
6. Graham ML, Janeczek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. Comp Med. 2011 ; 61(4) : 356-60.
7. Song M. The study of the changes of obesity-relating biomarkers in high fat fed-induced C57BL/6 mice. J Korean Med Obes Res. 2016 ; 16(1) : 19-26.
8. Kim MY, Van K, Kang YJ, Kim KH, Lee SH. Tracing soybean domestication history: from nucleotide to genome. Breed Sci. 2012 ; 61(5) : 445-52.
9. Kuroda Y, Tomooka N, Kaga A, Wanigadeva SMSW, Vaughan DA. Genetic diversity of wild soybean (Glycine soja Sieb. et Zucc.) and Japanese cultivated soybeans [G. max (L.) Merr.] based on microsatellite (SSR) analysis and the selection of a core collection. Genet Resour Crop Evol. 2009 ; 56(8) : 1045-55.
10. Park S, Lee H. Effects of legume supplementation on the gastrointestinal function and diabetic symptoms in streptozotocin-induced diabetic rats. Korean J Nutrition 1999 ; 32(6) : 617-27.
11. Lee D, Kwak D, Kim S, Ju E, Choi H, Kim O, et al. Effect of small black soybean powder on blood glucose and insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2004 ; 33(10) : 1618-25.
12. Kim M, Kim DK, Cha YS. Black Adzuki bean (Vigna angularis) extract protects pancreatic β cells and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. J Med Food. 2016 ; 19(5) : 442-9.
13. Pant MC, Uddin I, Bhardwaj UR, Tewari RD. Blood sugar and total cholesterol lowering effect of Glycine soja (Sieb and Zucc.), Mucuna pruriens (D.C.) and Dolichos biflorus (Linn.) seed diets in normal fasting albino rats. Indian J Med Res. 1968 ; 56(12) : 1808-12.
14. American Diabetes Association (ADA) [Internet]. Arlington, VA : ADA; [cited 2016 Nov 20]. Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/common-terms/>.
15. Blair M. Diabetes mellitus review. Urol Nurs. 2016 ; 36(1) : 27-36.

16. Lee JH, Kim YG, Choi MI. Effects of cytotoxic and antioxidant of methanol extracts from medicinal plants. *J Korean Orient Med Ophthal Otol Derm.* 2005 ; 18(3) : 37-43.
17. Cha BC, Park HJ, Lee E, Choi MY, Rhim TJ. Comparison of antioxidant activity and composition in *Glycine max* Merr. and *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Korean J Pharmacogn.* 1996 ; 27(3) : 190-5.
18. Zhou S, Sekizaki H, Yang Z, Sawa S, Pan J. Phenolics in the seed coat of wild soybean (*Glycine soja*) and their significance for seed hardness and seed germination. *J Agric Food Chem.* 2010 ; 58(20) : 10972-8.
19. Ngai PH, Ng TB. Purification of glysojanin, an antifungal protein, from the black soybean *Glycine soja*. *Biochem Cell Biol.* 2003 ; 81(6) : 387-94.
20. Krishnamurthy P, Tsukamoto C, Takahashi Y, Hongo Y, Singh RJ, Lee JD, et al. Comparison of saponin composition and content in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) before and after germination. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014 ; 78(12) : 1988-96.
21. Yuan H, Kim JT, Kim SH, Chung SH. Ginseng and diabetes. *J Ginseng Res.* 2012 ; 36(1) : 27-39.
22. Chakravarthy BK, Gupta S, Gode KD. Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan induced diabetic rats by (-)-epicatechin. *Life Sci.* 1982 ; 31(24) : 2693-7.
23. Tan MH, Alquraini H, Mizokami-Stout K, MacEachern M. Metformin: from research to clinical practice. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016 ; 45(4) : 819-43.
24. Moiola A, Maresca B, Manzione A, Napoletano AM, Coclite D, Pirozzi N, et al. Metformin associated lactic acidosis (MALA): clinical profiling and management. *J Nephrol.* 2016 ; 29(6) : 783-9.
25. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2006. *Diabetes Care.* 2006 ; 29(Suppl 1) : S4-42.

RETRACTED