



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2020년 2월
박사학위 논문

스트렙토조토신 유도 당뇨병
흰쥐에서 카테킨이 간, 근육 및
지방조직의 당질 및 지질대사
관련 유전자 발현에 미치는 영향

조선대학교 대학원

의 학 과

이 정 인

스트렙토조토신 유도 당뇨병
흰쥐에서 카테킨이 간, 근육 및
지방조직의 당질 및 지질대사 관련
유전자 발현에 미치는 영향

Effects of catechin on gene expression of glucose
and lipid metabolism-related proteins in liver,
muscle and adipose tissue of streptozotocin-induced
diabetic rats

2020년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 정 인

스트렙토조토신 유도 당뇨병
흰쥐에서 카테킨이 간, 근육 및
지방조직의 당질 및 지질대사 관련
유전자 발현에 미치는 영향

지도교수 신 병 철

이 논문을 의학박사 학위신청 논문으로 제출함

2019년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

이 정 인

이정인의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	<u>김 현 리</u> (인)
위 원	전남대학교 교수	<u>김 창 성</u> (인)
위 원	조선대학교 교수	<u>최 동 현</u> (인)
위 원	조선대학교 교수	<u>김 윤 성</u> (인)
위 원	조선대학교 교수	<u>신 병 철</u> (인)

2019년 12 월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	X
1. 서론	1
1-1. 당뇨병이란?	1
1-2. 당뇨병과 포도당 대사	1
1-3. 당뇨병의 원인 및 동향	2
1-4. 당뇨병의 종류	2
1-5. 당뇨병 관리	3
1-6. 당뇨병 합병증	4
1-7. 식물의 2차 대사산물	5
1-8. 카테킨과 당뇨병	7
1-9. 전사체 분석	7
1-10. 연구목적	8
2. 재료 및 방법	9
2-1. 실험재료	9
2-2. 실험동물	9

- 2-3. 시료 채취 및 검사 10
- 2-4. 조직 전사체 검사 11
- 2-5. 통계처리 12

- 3. 결과 13**
 - 3-1. 당뇨병 유도 흰쥐의 신체적 및 혈액 생화학적 소견 13
 - 3-2. 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 신체적 및 생화학적 소견에 미치는 영향 13
 - 3-3. 카테킨 당뇨병 흰쥐의 혈당량에 미치는 영향 14
 - 3-4. 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 신장손상에 미치는 영향 14
 - 3-5. 당뇨군의 간조직 포도당대사 관련 유전자 발현의 변화 15
 - 3-6. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 간 조직 포도당대사 관련 유전자 발현의 변화 15
 - 3-7. 당뇨군의 근육조직 포도당대사 관련 유전자 발현 의변화 16
 - 3-8. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 근육조직 포도당 대사 관련 유전자 발현의 변화 16

3-9. 당뇨군의 내장지방조직 포도당대사 관련
 유전자 발현의 변화 17

3-10. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 포도당
 대사 관련 유전자 발현의 변화 17

3-11. 대조군과 당뇨군의 간 조직 지질대사 관련
 유전자 발현의 변화 18

3-12. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 간 조직 지질대사
 관련 유전자 발현의 변화 18

3-13. 당뇨군의 근육조직 지질대사 관련 유전자
 발현의 변화 19

3-14. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 근육조직 지질대사
 관련 유전자 발현의 변화 19

3-15. 당뇨군의 내장지방조직 지질대사 관련 유전자
 발현의 변화 20

3-16. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화	20
3-17. 당뇨군의 간 조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 발현의 변화	21
3-18. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 간 조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 발현의 변화	21
3-19. 당뇨군의 근육조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 발현의 변화	22
3-20. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 근육조직 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화 ...	22
3-21. 당뇨군의 내장지방조직 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화	22
3-22. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화	23
4. 고찰	24
5. 요약	35
6. 참고문헌	37

표 목 차

Table 1. Physical and biochemical parameters of experimental animals	43
Table 2. Effect of catechin on physical and biochemical parameters in experimental animals	44
Table 3. Effects of catechin on blood urea nitrogen and creatinine in blood of diabetic rats	45
Table 4. Select liver transcripts in control versus DM rats related to glucose metabolism	46
Table 5. Select liver transcripts in DM versus DM+CA rats related to glucose metabolism	47
Table 6. Select soleus muscle transcripts in control versus DM rats related to glycolysis	48

Table 7. Select soleus muscle transcripts in DM versus DM+CA rats related to glycolysis	49
Table 8. Select visceral fat tissue transcripts in control versus DM rats related to glycolysis	50
Table 9. Select visceral fat tissue transcripts in DM versus DM+CA rats related to glycolysis	51
Table 10. Select liver transcripts in control versus DM rats related to lipid metabolism	52
Table 11. Select liver transcripts in DM versus DM+CA rats related to lipid metabolism	53
Table 12. Select soleus muscle transcripts in control versus DM rats related to lipid metabolism	54
Table 13. Select soleus muscle transcripts in DM versus DM+CA rats related to lipid metabolism	55

Table 14. Select visceral fat tissue transcripts in control versus DM rats related to lipid metabolism	56
Table 15. Select visceral fat tissue transcripts in DM versus DM+CA rats related to lipid metabolism	57
Table 16. Select liver transcripts in control versus DM rats related to insulin signaling	58
Table 17. Select liver transcripts in DM versus DM+CA rats related to insulin signaling	59
Table 18. Select soleus muscle transcripts in control versus DM rats related to insulin signaling	60
Table 19. Select soleus muscle transcripts in DM versus DM+CA rats related to insulin signaling	61
Table 20. Select visceral fat tissue transcripts in control versus DM rats related to insulin signaling	62

Table 21. Select visceral fat tissue transcripts
in DM versus DM+CA rats related to
insulin signaling 63

도 목 차

Fig. 1. Flavonoid structure	64
Fig. 2. Chemical structure of flavonoid	65
Fig. 3. Effects of catechin on fasting blood glucose (FBG) in diabetic rats	66

ABSTRACT

Effects of catechin on gene expression of glucose and lipid metabolism-related proteins in liver, muscle and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats

Lee Jung-In

Advisor : Prof. Shin Byoung-Chul, M.D, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Background : Diabetes patients continue to increase worldwide, and persistent hyperglycemia could induce diverse complications, such as diabetic nephropathy, diabetic cardiovascular complications, neuropathy, eye, and liver complications. Since diabetic complications significantly reduce the quality of life, much research is being conducted to prevent their progress. Recently, there has been a search for natural products for the prevention of diabetes and the prevention of complications. Flavonoids are found in many plants and are known to have various physiological activities such as antioxidant, anticancer and anti-inflammatory effects. Catechin, a flavonoid contained in tea, is known to have antidiabetic effects in improving hyperglycemia in vivo and in vitro.

Objective : The purpose of this study was to investigate the transcriptoms of liver, muscle and adipose tissue to observe the effects of catechin on lipid and glucose metabolism in diabetes.

Methods : Diabetes mellitus in SD rats was induced by high fat diet and streptozotocin. The experimental group was divided into control group, diabetes group and diabetes + catechin group. The control and diabetic groups received tap water as drinking water and the diabetic + catechin group received tap water containing 0.1% catechin as drinking water for 12 weeks. After 12 weeks, blood glucose, BUN and creatinine levels were measured in the blood and transcriptomes were examined in liver, soleus muscle and visceral fat. The gene expression levels of glucose metabolism-related enzymes, lipid metabolism-related enzymes and insulin signaling pathway-related proteins were compared between each experimental group.

Results : Fasting blood glucose did not change until 12 weeks in the control and diabetic groups. Fasting blood glucose in the diabetic + catechin group was decreased by 8%, 13%, 15% and 18% at 2, 4, 8 and 12 weeks, respectively, compared to the diabetic group. After 12 weeks, serum BUN levels in the diabetic + catechin group decreased by 35% and serum creatinine levels by 33%, respectively, compared to the diabetic group. Glucose metabolism-related genes in the diabetic group were decreased in liver Gck, Pdp2 and Phkb mRNA levels, and Aldob mRNA levels in soleus muscle were decreased. In diabetic group, expression of Pfkf, Eno3 and Pgam2 in visceral fat were increased and Aldob and Pklr expression was decreased. Hepatic Gck, Pdk4 and Phkb mRNA levels were increased in the diabetic + catechin group compared to the diabetic group. Hepatic tissue Acsf2 and Acss3 mRNA levels in the diabetic group were changed. The levels of Pla2g2a, Lpl, Acsf2, Acad11, and Acaa2 mRNA in soleus muscle of diabetic rats were increased and the Pld3 mRNA levels were decreased. Acacb mRNA levels were increased and

Fasn and Slc27a1 mRNA levels were decreased in diabetic visceral adipose tissue.

Compared with the diabetic group, hepatic Acaca, Acacb and Acss3 mRNA levels were increased in the diabetic+catechin group. Hepatic Insr mRNA levels of diabetic rats were decreased, muscle tissue Irs1 mRNA levels were decreased, and there was no difference in expression levels of these genes in visceral tissues. Compared with the diabetic group, hepatic insr mRNA and muscle tissue Irs1 mRNA levels were increased in the diabetic+catechin group.

CONCLUSIONS: These results suggest that catechin administration improves hyperglycemia in diabetic rats. Catechin has the effect of improving diabetic hyperglycemia, which is thought to be the result of increased expression of liver glucose metabolism related enzymes and proteins related to insulin signal transduction pathways. Further study is needed to elucidate the mechanism of action on catechin gene expression and its usefulness as a functional substance.

Key words : Catechin, Diabetes mellitus, Glucose metabolism, Lipid metabolism

1. 서 론

1-1. 당뇨병이란 ?

당뇨병이란 당질의 대사장애로 인하여 혈액중의 포도당 농도가 지속적으로 증가되는 만성 대사성 질환이다. 포도당은 탄수화물을 구성하는 단위성분으로 위장에서 소화효소에 의해 포도당으로 분해되어 흡수되어 혈당이 증가한다. 혈액 포도당은 세포에서 대사되어 이용되는데, 포도당 대사에 인슐린이 작용한다. 인슐린은 췌장 랑게르한스섬에서 분비되는 호르몬으로 혈당이 증가하면 분비되어 혈당을 낮추는 기능을 한다. 인슐린의 분비가 감소하거나 기능이 떨어지게 되면, 혈당이 증가하여 소변으로 넘쳐 나오게 되며, 이런 병적인 상태가 당뇨병이다. 당뇨병은 공복 혈당치 126 mg/dL 이상, 식후 2 시간 혈당치 200 mg/dL 이상, 당화혈색소 6.5% 이상이면 당뇨병으로 진단한다(1.2).

1-2. 당뇨병과 포도당 대사

포도당은 모든 세포에서 에너지원으로 이용되는 가장 중요한 열량소이다. 포도당은 해당 과정, 시트르산 회로, 산화적 인산화 과정을 거쳐서 ATP 를 생산하여 이용된다. 해당 과정은 1 분자의 포도당을 2분자의 피루브산으로 전환하는 과정으로 10가지 효소가 관여하는 반응이다. 해당 과정을 조절하는 효소는 hexokinase, phosphofructokinase-1 및 pyruvate kinase 등 3 가지인데, 인슐린은 pyruvate kinase 의 활성을 증가시켜서 해당 과정을 증가시킨다. 혈당이 증가하면 포도당은 간이나 근육세포에서 글리코겐 합성 효소에 의해서 글리코겐으로 전환되고, 간이나 지방세포에서는 지방산으로 합성된다. 인슐린은 글리코겐과 지방산합성에 작용하는 glycogen synthase 와 acetyl CoA carboxylase의 활성을 증가시켜서 증가한 혈당을 낮추는 작용을

한다. 당뇨병은 인슐린의 분비가 감소하거나 기능이 떨어지는 질환이기 때문에 이들 효소의 pyruvate kinase, glycogen synthase 및 acetyl CoA carboxylase 활성 조절 기능에 장애가 나타나서 포도당 분해 감소, 글리코겐 합성 감소 및 지방합성 감소가 나타나고, 혈당이 증가할 수 있다(3,4).

1-3. 당뇨병의 원인 및 동향

당뇨병의 발병 원인은 아직 정확하게 규명이 되어있지 않다. 현재까지 당뇨병은 유전적 요인과 환경적 요인이 서로 작용하여 발병하는 것으로 알려져 있다(1). 부모가 모두 당뇨병이면 자녀가 당뇨병이 생길 가능성은 30% 정도 이고, 한 사람만 당뇨병인 경우는 15% 정도로 알려져 있다. 환경적 요인으로 비만, 식생활, 운동부족, 스트레스, 연령, 약물, 감염 및 수술 등 이 있다. 당뇨병은 전 세계적으로 환자 수가 계속 증가하고 있는데, 국제당뇨병연맹(IDF)의 보고에 의하면 2017 년 당뇨병 환자 수는 4.51 억 명으로 추정되며, 2045 년에는 6.93억 명으로 증가 될 것으로 예상하고 있다(5). 우리나라도 최근 들어 당뇨병 인구가 늘고 있는데, 당뇨병 팩트시트 2018(2011~2016년 통합, 국민건강영양조사 기반) 에 따르면 2016 년 기준 30 세 이상 대한민국 국민의 당뇨병 유병률은 14.4% 로 당뇨병 환자는 501 만 7000 명으로 집계됐다(6).

1-4. 당뇨병의 종류

당뇨병은 보통 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 임신성 당뇨병 등 세 가지로 형태로 나눈다(1). 제1형 당뇨병은 자가면역기전, 바이러스, 감염 등에 의해 췌장의 베타세포가 파괴되어 인슐린 분비량이 부족하여 발생하기 때문에 인슐린 의존 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus:IDDM) 또는 연소성 당뇨병(juvenile diabetes) 이라고 한다. 주로 30대 이전 성인이나 소

아에서 발생한다(1,2).

제2형 당뇨병은 세포가 인슐린에 적절하게 반응하지 못하는 인슐린 저항 (Insulin resistance)으로 시작된다. 인슐린-비의존 당뇨병(Non insulin dependant diabetes mellitus : NIDDM) 또는 성인 당뇨병(adult-onset diabetes) 이라고도 한다(1,5). 제2형 당뇨병은 당뇨병 환자의 대부분을 차지한다. 생활 수준의 향상으로 열량의 과잉섭취가 많거나 상대적으로 운동량이 감소하고 많은 스트레스에 노출되면 인슐린의 성능이 떨어져서 당뇨병이 발현될 수 있으며, 조절하지 않으면 인슐린 분비의 감소가 따르게 된다(5,6). 임신성 당뇨병은 원래 당뇨병이 없던 사람이 임신 20 주 이후에 당뇨병이 처음 발견되는 경우로서 임신 중에 일어나는 호르몬 변화 등 생리학적 변화와 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 임신성 당뇨병은 출산 후에는 대부분 정상 혈당으로 돌아오지만, 임신성 당뇨병이 있었던 여성에서 제 2 형 당뇨병이 발생할 가능성은 높다(5,6).

1-5. 당뇨병 관리

당뇨병은 식사요법, 운동요법 및 약물요법으로 관리한다. 당뇨병 관리에서 가장 기본적이고 중요한 요소는 혈당을 적절히 조절하는 것이다. 당뇨병 환자 관리에서 바람직한 혈당조절 목표는 식전 혈당 80~130 mg/dL, 식후 2시간 혈당 180 mg/dL 미만, 당화혈색소 6.5% 미만으로 유지 시키는 것이다. 혈당 조절은 먼저 식사요법과 운동요법으로 관리한다(6,7). 식사요법이나 운동요법으로 혈당조절이 목표치에 도달하지 못하면 약물요법을 병행한다. 약물요법은 혈당조절 정도에 따라 경구 혈당강하제와 인슐린 주사를 단독 또는 병용하여 사용한다. 경구용 혈당 강하제는 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비를 자극하거나, 말초에서의 인슐린의 작용을 촉진함으로써 혈당조절에 도움을 주는 제제와 포도당의 소화 및 재흡수를 억제하는 제제가 있다.(6,7)

경구용 혈당강하제의 종류는 설펜요소제(sulphonylureas), 바이구아나이드계(biguanides), 알파글루코시데이즈억제제(α -glucosidase inhibitor), 티아졸리딘디온계(thiazolidine diones), 메글리티나이드계(meglitinide), 디피피 4 억제제(dipeptidyl peptidase-IV inhibitors) 및 나트륨-포도당 공동수송체-2 억제제(Sodium glucose cotranporter-2 inhibitors) 등이 있다(6,8). 설펜요소제는 췌장의 베타세포를 자극하여 인슐린 분비를 촉진하는 작용을 하고, 바이구아나이드계는 간에서 포도당 신생을 억제하고, 말초 조직에서 인슐린의 작용을 도와주며, 알파글루코시데이즈 억제제는 상부 위장관에서 당질 분해 효소의 작용을 억제해 당의 소화, 흡수를 지연시킨다. 티아졸리딘디온계는 근육과 지방에서 인슐린 감수성을 개선해 주며, 간에서 포도당 신생을 억제하고, 메글리티나이드계는 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 촉진한다. 디피피 4 억제제는 소장에서 분비되는 인크레틴을 분해하는 효소인 DPP-4 를 억제하여, 인크레틴의 인슐린 분비를 촉진작용과 글루카곤 분비를 억제작용을 증가시킨다. 나트륨-포도당 공동 수송체-2 억제제는 신장에서 포도당을 재흡수하는 나트륨-포도당 공동 수송체-2를 억제하여 소변으로 당을 배출시킨다(6,8).

1-6. 당뇨병 합병증

당뇨병 환자에서 잘 조절되지 않은 고혈당이 오랫동안 지속할 경우 합병증이 유발될 수 있다. 당뇨병의 급성 합병증으로는 당뇨병 케톤산증, 고혈당성 고삼투성 비케톤성 혼수 등이 있고, 만성 합병증으로는 심혈관질환, 뇌졸중, 만성신부전, 당뇨병성 궤양, 당뇨망막병 등이 있다.(5,9) 당뇨병 치료 기술 및 약제의 발달에 따라 당뇨병의 급성 합병증이나 감염으로 인한 사망률은 감소하였으나, 당뇨병의 만성 합병증 환자 수는 감소하지 않았다. 국민건강보험공단이 발표한 당뇨병 현황 자료에 따르면, 2016년 당뇨병 합병증 환자

는 84만여 명으로 5년 새 26% 늘었으며, 당뇨병 망막증 환자가 36만 명, 말초 신경병증 환자가 34만 명 그리고 당뇨병으로 인한 만성 신부전증 환자가 14만 명이다(6,10). 따라서, 최근의 당뇨병 치료 목표는 이러한 만성 합병증의 발생을 예방하고 지연시키는 데 초점이 맞추어지게 되었다. 당뇨병 합병증은 고혈당으로 인하여 혈관 내피세포에서 증가되는 반응성 산소(Reactive oxygen species: ROS)가 중요한 요인으로 알려져 있다(11). 반응성 산소는 반응성이 강한 산화제 역할을 하므로 세포의 지질, 단백질 및 핵산에 산화적 손상을 유발할 수 있으며, 혈관내피세포의 산화적 손상은 당뇨병성 합병증 발생과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(11). 당뇨병성 합병증의 발생을 예방하기 위하여 산화적 손상을 예방할 수 있는 항산화 물질에 대한 연구가 이루어지고 있으며 천연물 소재 기능성 물질에 대한 관심이 증가하고 있다(12).

1-7. 식물의 2 차 대사산물

세포의 대사과정에서 만들어지는 물질을 대사산물이라 하며, 식물세포에는 1차와 2차 대사산물이 있다. 1 차 대사산물은 생명 유지에 필요한 탄수화물, 지방, 단백질과 같은 물질이고, 2 차 대사산물은 생명 유지에 필수적이지는 않지만, 세포가 살아가는 데 유용한 물질이다. 식물의 2차 대사산물은 생존을 위한 방어, 유인, 경쟁 등에서 기능을 나타내는 것으로 밝혀지고 있으며, 사람들은 이들을 이용하여 의약품, 향료, 색소 등으로 개발하여 이용하고 있다(13). 식물 2차 대사산물의 종류는 알칼로이드(alkaloids), 플라보노이드(flavonoids), 카로티노이드(carotenoids), 글리코사이드(glycosides), 테르페노이드(terpenoids) 등이 알려져 있다.(13,14)

플라보노이드는 식물 2 차 대사산물의 일종으로 어원은 노랄다는 뜻의 라틴어 flavus에서 유래하였다. 플라보노이드의 화학구조는 두 개의 페닐 고리(A와 B)와 헤테로 사이클릭 고리(C)로 구성된 15 개의 탄소 골격 구조로 되

어 있다.(14)

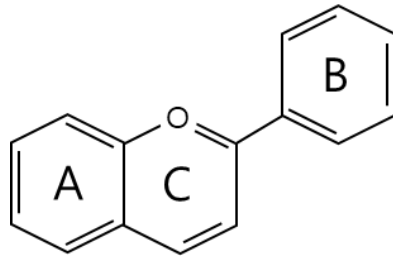


Fig. 1. Flavonoid structure : 2 phenyl rings (A and B), 1 heterocyclic ring (C)1.

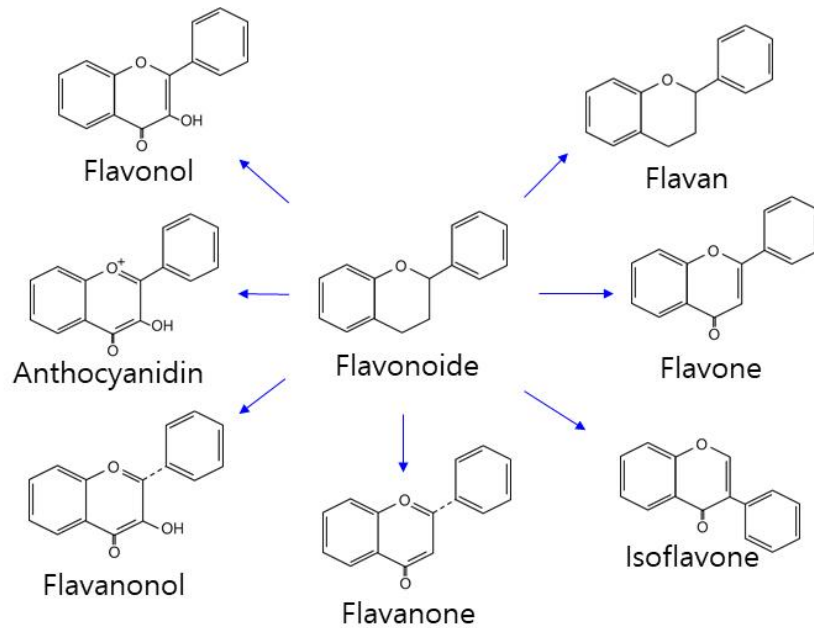


Fig. 2. Chemical structure of flavonoids

플라보노이드는 그 구조에 따라서 안토잔틴(Anthoxanthin), 플라바논(Flavanone), 플라바노놀(Flavanonol), 플라반(Flavan), 안토시아니딘(Anthocyanidin), 이소플라본(isoflavone) 등 6 가지로 나눌 수 있다.(14)

1-8. 카테킨과 당뇨병

녹차(*Camellia sinensis* L.)에는 2차 대사산물인 카테킨이 대량 함유되어 있는데, 녹차잎에 함유된 카테킨의 양은 전체 수용성 물질의 30~40% 정도로 매우 높다(15). 카테킨은 플라보노이드의 플라빈류에 포함된 식물의 2차 대사산물로서 항산화 작용이 큰 물질로 알려져 있다. 녹차 카테킨의 종류는 epicatechin(EC), epicatechin-3-gallate(ECG), epigallocatechin(EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등이 있다(15). 녹차 카테킨은 체내에서 지방이나 포도당 대사에 작용하여 비만을 억제하고, 혈당조절을 개선하며 심혈관 질환 발생의 위험성을 감소시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(16). Iso 등(17)은 역학조사결과 녹차음용이 2형 당뇨병 발생을 억제한다고 하였고, 양등(18)은 당뇨병 흰쥐에 카테킨이 신장합병증을 예방하는 효과가 있다고 하여 당뇨병 예방과 당뇨병성 합병증 예방에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다.

1-9. 전사체 분석

유전자를 분석하여 질병의 발생과 연관시키려는 연구가 많이 진행되고 있는데, 최근에 세포에서 일정 시점에 발현되는 전체 RNA 즉 전사체(transcriptome)에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(19,20). 전사체는 세포나 조직에서 한 시점에 발현되는 전체 RNA를 의미하며, 전사체를 분석하면 조직이나 세포에 따라 발현되는 유전자들의 정보를 얻을 수 있으며, 이러한 전사체 분석을 통해서 정상 세포와 비정상 세포 간의 발현되는 RNA 차이를 알 수 있으며 질병과 관련한 유전자를 파악하고, 그에 알맞은 치료를 시행할 수 있는 자료로 활용될 수 있다. 전사체 분석은 RNA Sequencing(염기서열 분석), Alignment(정렬), Analysis(분석)의 세 단계로 나눌 수 있다. 염기서열 분석이란 A(아데닌), G(구아닌), C(시토신), T(티민)로 이루어진 유전체

서열을 사람이 이해할 수 있는 기호로 번역하는 단계이다. 세포에서 발현된 mRNA 를 cDNA로 만들어 염기서열을 분석하여 표준 유전체와 대조하여 파악한다. 정열이란 분석한 유전자 염기서열을 표준 유전체와 대조하여 일치하는 부분의 위치를 찾는 작업이므로, 위치와 양을 분석하여 유전자의 종류와 발현량을 알 수 있다. 분석은 측정된 유전자의 종류와 발현량을 이용하여 특정 조직과 유전자 간의 연관성을 밝히거나 유전자들 사이의 연관성 등을 찾는 작업이다.

1-10. 연구목적

당뇨병의 발생과 합병증 발생에 세포의 산화적 손상이 중요한 기전으로 알려져 있으며, 항산화 물질은 산화 손상을 방지 할 수 있으므로 당뇨병의 예방과 합병증 예방에 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 당뇨병은 당질 대사와 지질대사의 변화가 일어나고 고혈당과 이상지질혈증이 초래되어 당뇨병성 혈관합병증이 유발되고 당뇨병성 합병증이 초래될 수 있다. 따라서 당뇨병 환자에서 당질 대사와 지질대사의 변화는 당뇨병성 합병증의 발생과도 밀접한 연관이 있다고 할 수 있다. 당질대사와 지질대사는 대사과정에 관여하는 효소의 활성에 의해서 이루어지고 조절된다. 본 연구에서는 당뇨병 혈당조절에 효과가 있는 것으로 알려진 카테킨이 당질 대사와 지질대사에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당질과 지질대사의 대사과정에 관여하는 효소와 인슐린 신호전달 과정에 관여하는 단백질의 유전자 발현량을 전사체를 분석하여 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

본 실험에 사용된 카테킨은 polyphenon 60(P60) 로서 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 에서 구매하여 사용하였다. 당뇨병 유발에 사용한 Streptozotocin(STZ), sodium citrate 와 단백질 측정 kit 및 인슐린 측정 kit는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 에서 구매하여 사용하였다. 혈당은 혈당측정기 ACCU-CHEK을 Roche Diagnostics(Mannheim, Germany) 에서 구매하여 이용하였다. 고지방식이(지방 45%) 는 샘타코(Samtako, Daejeon, Korea) 에서 구매하여 사용하였다.

2-2. 동물실험

실험동물은 체중 생후 5 주 된 Sprague-Dawely 종 수컷 흰쥐로 샘타코에 서 구매하여 1 주일간 사육한 후 실험에 이용하였다. 실험동물은 12 시간 명암주기, 온도 20 ± 2 °C 상대습도 $60 \pm 5\%$ 의 환경에서 사육하였다. 동물 실험은 조선대학교 동물실험 윤리 위원회 승인(승인번호: CIACUC2017-S0037) 을 받아 실험윤리 규정에 따라서 실시하였다. 당뇨병의 유발은 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신을 사용하여 유발하였다. 실험동물을 45% 고지방식이 (45 kcal% fat) 사료를 급여하여 4주일간 사육한 후 0.05M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 스트렙토조토신(streptozotocin 35 mg/kg BW)를 흰쥐의 복강에 2일 간격으로 3회 주사하였고, 대조군에는 0.05 M citrate buffer를 복강에 주사하였다. 스트렙토조토신 주사 후부터 실험동물은 일반 사료를 공급하여 사육하였다. 스트렙토조토신 최종 주사 1주일 후 혈당을 측정하여 혈당이 300 mg/dL 이상인 쥐를 당뇨군으로 분류하였다. 실험군은 대

조군(control), 당뇨군(diabetes mellitus: DM), 당뇨+카테킨(DM+CA)군 등 총 3군으로 나누었고, 각 실험군의 동물 수는 5마리로 하였다. 대조군과 당뇨군은 식수로 수돗물을 공급하였고, 당뇨+카테킨군은 수돗물에 P60 을 0.1%(w/v) 농도로 용해해서 식수로 공급하여 12 주일 동안 사육하였다.

2-3. 시료 채취 및 검사

실험 시작 후 2 주 간격으로 12 주까지 실험동물의 공복혈당을 측정하였다. 공복혈당은 실험동물을 12 시간 금식시킨 뒤 꼬리 정맥에서 혈액을 채혈하여 혈당측정기 ACCU-CHEK를 이용해 측정하였다. 실험동물은 질소가스로 마취시켜 개복 후 복부 정맥에서 혈액을 채취하고, 복부지방, 간 및 가자미근(soleus muscle)을 절제하였다. 채취된 혈액 일부는 즉시 혈장을 분리하여 인슐린을 측정하고, 나머지는 응고시킨 후 혈청을 분리하여 지질, BUN(blood urea nitrogen) 및 creatinine 정량을 위한 시료로 사용하였다. 혈장 인슐린은 인슐린 측정 장비(Insulin ELISA kit)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 제조사의 방법에 따라서 반응시킨 후 ELISA plate reader(TECAN. Männedorf, Switzerland) 로 흡광도를 측정하여 인슐린 양을 계산하였다. 혈청 지질, BUN 및 creatinine 농도는 혈액 자동분석기(Hitachi 7180, Tokyo, Japan) 를 이용하여 측정하였다. 인슐린 저항성 지수인 homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR)는 Matthews 등(21)의 방법에 따라 산출하였다. 인슐린 저항지수 계산식은 다음과 같다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{Insulin}(\mu \text{ units/mL}) \times \text{glucose}(\text{mmol/L})/22.5$$

2-4. 조직 전사체(transcriptome) 검사

간, 복부지방 및 가자미근을 일부 절제하여 TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) 를 이용하여 total RNA 를 분리하였다. 각 조직에서 분리한 total RNA 의 안정성은 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 를 사용하여 BioAnalyzer 2100 automated electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 을 이용하여 분석하였다. 안정성이 확인된 각 조직 RNA는 TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (illumina, San Diego, CA, USA) 을 이용하여 제조사의 방법에 따라서 mRNA sequencing library 를 만들었고, mRNA library는 Agilent DNA High sensitivity Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 를 이용하여 BioAnalyzer 2100 로 분석하였다. 조직으로 만들어진 mRNA library 는 CFX96 real time system (BioRad, Hercules, CA, USA) 을 이용하여 정량 분석 한 후 Illumina HiSeq 2500 를 이용하여 RNA sequencing 분석을 실시하였다. 각 조직으로 만들어진 cDNA libraries 는 TruSeq flow cell 을 이용하여 cDNA libraries의 clusters 를 만든 다음 TruSeq 200 cycle SBS kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 를 이용하여 100bp-end read 로서 염기서열을 분석하였다. Illumina HiSeq 2500 에서 수집된 cDNA libraries 의 염기서열 정보는 FASTQ format 의 정보와 비교하여 분석하였다. Gene set 의 분석은 DAVID Bioinformatics Resources6.7, NIH(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) 에서 Functional Annotation Tool을 이용 하였다(22). 실험군간의 유전자 발현 차이는 reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) 값을 이용하여 fold-change false discovery rate (FDR) 을 측정하여 $p < 0.05$ 인 것을 유의한 것으로 하였다.

2-5. 통계처리

RNA-seq를 제외한 모든 측정 결과는 평균± 표준편차(mean± SD)로 표시하였고, 실험결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석 (ANOVA)을 실시하였고, 시료 간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결 과

3-1. 당뇨병 유도 흰쥐의 신체적 및 혈액 생화학적 소견

고지방식이 투여와 저용량 스트렙토조토신 주사로 당뇨병이 유도된 흰쥐의 특성을 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 식이섭취량은 당뇨군이 대조군보다 46%가 증가되었고, 체중은 당뇨군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다. 공복혈당은 당뇨군에서 187.3 ± 29.7 mg/dL로 대조군의 86.5 ± 10.1 mg/dL에 비하여 약 117%가 증가되었다. 혈장인슐린 양은 당뇨군 8.0 ± 0.6 μ U/L, 대조군 8.5 ± 0.6 μ U/L로 두군 간에 차이가 없었으며, 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR은 당뇨군 3.8 ± 0.6 , 대조군 1.8 ± 0.3 로 대조군에 비하여 당뇨군에서 약 111% 높게 나타났다. 중성지방량은 당뇨군에서 163.3 ± 17.1 mg/dL로 대조군의 77.2 ± 6.5 mg/dL에 비하여 당뇨군에서 약 111%가 증가되었다.

3-2. 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 신체적 및 혈액 생화학적 소견에 미치는 영향

당뇨병 흰쥐에 카테킨을 12주간 투여한 후 관찰한 신체적 및 혈액 생화학적 소견은 Table 2와 같다. 식이섭취량은 대조군 19.8 ± 3.1 g/day/rat, 당뇨군 29.2 ± 4.5 g/day/rat, 당뇨+카테킨군 26.5 ± 3.9 g/day/rat으로 대조군에 비하여 당뇨군에서 약 52%가 증가되었고, 당뇨군과 당뇨+카테킨군 사이에 식이섭취량의 차이는 없었다. 체중은 대조군과 당뇨군 및 당뇨+카테킨군 사이에 유의한 차이가 없었다. 공복혈당은 당뇨군에서 211.3 ± 20.7 mg/dL로 대조군의 88.7 ± 8.7 mg/dL에 비하여 약 139%가 증가되었고, 당뇨+카테킨군은 171.3 ± 16.5 mg/dL로 당뇨군보다 18% 감소되어 카테킨투여로 당뇨 흰쥐의 공복혈당이 감소됨을 보여주고 있다. 혈청 인슐린 양은 대조

군, 당뇨군 및 당뇨+카테킨군 사이에 유의한 차이가 없었으며, 인슐린저항성
 지수인 HOMA-IR은 당뇨군에서 4.0 ± 0.5 로 대조군의 1.7 ± 0.4 mg/dL 에
 비하여 약 98% 가 증가되었고, 당뇨+카테킨군은 3.3 ± 0.5 mg/dL로, 당뇨군
 과 당뇨+카테킨군 사이에 유의한 차이가 없었다. 혈장 중성지질량은 당뇨군
 에서 179.5 ± 17.2 mg/dL로 대조군의 78.7 ± 9.5 mg/dL 에 비하여 129% 가
 증가 되었고, 당뇨+카테킨군은 135.7 ± 12.3 mg/dL로 당뇨군보다 중성지질
 량이 24% 감소됨을 보여주고 있다.

3-3. 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 혈당량에 미치는 영향

카테킨을 당뇨흰쥐에 경구투여하면서 12 주간 공복혈당을 측정 결과는
 Fig.3 과 같다. 대조군의 공복혈당은 실험시작 때인 0 주 86 ± 10 mg/dL,
 12 주 88 ± 11 mg/dL로 12 주까지 유의한 공복혈당의 변화를 나타내지 않았
 다. 당뇨군의 공복혈당은 0 주, 2 주, 4 주, 8 주 및 12 주에 각각 $187 \pm$
 21 mg/dL, 192 ± 19 mg/dL, 201 ± 17 mg/dL, 214 ± 18 mg/dL 및 $211 \pm$
 17 mg/dL 으로 시간의 흐름에 따른 유의한 변화는 없었다. 당뇨+카테킨군의
 공복혈당은 0주 191 ± 19 mg/dL로 당뇨군과 차이가 없었으나, 2 주, 4 주,
 8 주 및 12 주에는 당뇨군에 비하여 8%, 13%, 15%및 18%가 각각 감소되어 당
 뇨흰쥐에 카테킨을 투여하면 공복혈당이 감소됨을 보여주고 있다.

3-4. 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 신장손상에 미치는 영향

당뇨병 흰쥐에 카테킨을 12 주 동안 투여한 후 혈청 BUN과 creatinine 농
 도를 측정 결과는 Table 3 과 같다. 혈청 BUN 값은 당뇨군에서 79.5 ± 10.3
 mg/dL로 대조군 21.7 ± 4.1 mg/dL 보다 266% 가 증가되어 당뇨군에서 신장
 손상이 있음을 보여주고 있다. 당뇨+카테킨군의 혈청 BUN은 51.1 ± 9.7
 mg/dL로 당뇨군보다 35% 가 감소되어 신장손상이 더 낮게 일어남을 보여주고

있다. 혈청 creatinine 값은 당뇨군에서 1.13 ± 0.15 mg/dL로 대조군보다 3.7 배로 증가되어 당뇨군에서 신장손상이 있음을 보여주고 있고, 당뇨+카테킨군은 0.75 ± 0.1 mg/dL로 당뇨군보다 33% 가 감소되어 신장손상이 완화되었음을 보여주고 있다.

3-5. 당뇨군의 간 조직 포도당대사 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12 주 후에 흰쥐를 희생시켜 간 조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현 양의 차이를 비교한 결과는 Table 4와 같다. 당뇨군 간 조직 glucokinase isoform 2(Gck), ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type(Pfkl), fructose-bisphosphate aldolase B(Aldob), pyruvate kinase PKM isoform M1 (Pkm), pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2(Pdk2), [Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 2, mitochondrial precursor(Pdp2), [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial(Pdk4), glycogen phosphorylase, liver form(Pygl) 및 phosphorylase b kinase regulatory subunit beta(Phkb) mRNA 량을 대조군과 비교하였다. 당뇨군의 간 조직 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 량이 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1 이하, p 값 0.05 이하로 유의하게 감소되었고, 다른 유전자의 변화는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-6. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 간 조직 포도당대사 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12 주 동안 투여한 후 희생시켜 간 조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 5와 같다. 당뇨+카테킨군의 간조직 Gck, Pfkl, Aldob, Pkm, Pdk2, Pdp2,

Pdk4, Pygl 및 Phkb mRNA 량을 당뇨군과 비교한 결과 당뇨군+카테킨군의 간 조직 Gck, Pdk4 및 Phkb mRNA 량이 당뇨군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 1 이상, p 값 0.05 이하로 유의하게 증가 되었고, 다른 유전자의 변화는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-7. 당뇨군의 근육조직 포도당대사 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12 주 후에 흰쥐를 희생시켜 가자미근조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현 량의 차이를 비교한 결과는 Table 6과 같다. 당뇨군 가자미 근조직 hexokinase-1 isoform HK1(HK1), ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type(Pfkm), Aldob, beta-enolase(Eno3), pyruvate kinase PKM isoform M1(Pkm) 및 glycogen phosphorylase, muscle form(Pygm) mRNA 량을 대조군과 비교하였다. fructose 1,6-bisphosphate를 분해시키는 효소인 Aldob mRNA 량이 대조군에 비하여 당뇨군의 가자미근조직에서 $\log_2(FC)$ 값 -5.02, p 값 0.0234 로 유의하게 감소되었고, 다른 유전자의 변화는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-8. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 근육조직 포도당 대사 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12 주 동안 투여한 후 희생시켜 가자미근조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 당뇨군과 비교한 결과는 Table 7과 같다. 당뇨+카테킨군의 가자미근조직 Hk1, Pfkm, Aldob, Eno3, Pkm 및 Pygm mRNA 량을 당뇨군과 비교한 결과 당뇨군+카테킨군에서 Aldob mRNA 량이 당뇨군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 3.40, p 값 0.0116 으로

유의하게 증가 되었고, 다른 유전자의 변화는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-9. 당뇨병군의 내장지방조직 포도당대사 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12주후에 흰쥐를 희생시켜 내장지방조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는 Table 8과 같다. 당뇨병군 내장지방조직 Hk1, Pfk, Aldob, Eno3, phosphoglycerate mutase 2(Pgam2) 및 pyruvate kinase PKLR(Pk1r) mRNA 양을 대조군과 비교하였다. 당뇨병군의 내장지방조직 Pfk, Eno3 및 Pgam2 는 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상, p 값 0.05 이하로 유의하게 증가 되었고, Aldob 와 Pk1r 은 $\log_2(FC)$ 값 -6.69 와 -6.69 , p 값 0.0004 와 0.0012 로 유의하게 감소됨을 보여주고 있으며, Hk1 mRNA 는 두군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3-10. 당뇨병군과 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 포도당 대사 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12 주 동안 투여한 후 희생시켜 내장지방조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 당뇨병군과 비교한 결과는 Table 9과 같다. 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 Hk1, Pfk, Aldob, Eno3, Pgam2 및 Pk1r mRNA 양을 당뇨병군과 비교한 결과 당뇨병군+카테킨군에서 Pfk, Eno3 및 Pgam2는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이하, p 값 0.05 이하로 유의하게 감소되었고, Aldob는 $\log_2(FC)$ 값 4.13 , p 값 0.00025 로 유의하게 증가됨을 보여주고 있으며, Hk1 과 Pk1r 은 두군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3-11. 대조군과 당뇨군의 간 조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12주후에 흰쥐를 희생시켜 간 조직 전사체를 분석하여 지질대사 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는 Table 10과 같다. 당뇨군 간 조직 fatty acid synthase(Fasn), acetyl-CoA carboxylase alpha(Acaca), acetyl-CoA carboxylase 2 precursor(Acacb), acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial precursor(Acsf2), acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial isoform 2(Acss3), long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor(Acadl), enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor(Echs1), 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2(Hsd17b10) 및 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial(Acaa2) mRNA 량을 대조군과 비교하였다. 당뇨군의 간 조직에서 Acsf2 mRNA 량이 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 1.96, p값 0.00185 로 유의하게 증가 되었고, Acss3 mRNA 량은 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1.61, p 값 0.00915 로 유의하게 감소되었다. 당뇨군의 간 조직 Fasn, Acaca, Acacb, Acadl, Echs1, Hsd17b10 및 Acaa2 mRNA 량은 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-12. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 간 조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12주 동안 투여한 후 희생시켜 간 조직 전사체를 분석하여 지질대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 11과 같다. 당뇨+카테킨군의 간조직 Fasn, Acaca, Acacb, Acsf2, Acss3, Acadl, Echs1, Hsd17b10 및 Acaa2 mRNA 량을 당뇨군과 비교한 결과 당뇨군+

카테킨군에서 *Acaca*, *Acacb* 및 *Acss3* mRNA 양은 당뇨군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 1 이상, p 값 0.05 이하로 유의하게 증가 되었고, *Acsf2* mRNA 양이 당뇨군 조직에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1.88, p 값 0.001 로 유의하게 감소됨을 보여주고 있다. 당뇨+카테킨군의 간조직 *Acad1*, *Echs1*, *Hsd17b10* 및 *Acaa2* mRNA 양은 당뇨군과 비교하여 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-13. 당뇨군의 근육조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12주후에 흰쥐를 희생시켜 가자미근조직 전사체를 분석하여 지질대사 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는 Table 12와 같다. 당뇨군 가자미근조직 phospholipase A2, membrane associated precursor(*Pla2g2a*), lipoprotein lipase precursor(*Lpl*), phospholipase D3(*Pld3*), *Acsf2*, acyl-CoA dehydrogenase family member 11(*Acad11*), *Acaa2*, *Hsd17b10* 및 *Echs1* mRNA 양을 대조군과 비교하였다. 당뇨군의 가자미근조직 *Pla2g2a*, *Lpl*, *Acsf2*, *Acad11* 및 *Acaa2* mRNA 양이 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 1 이상, p 값 0.05 이하로 유의하게 증가 되었고, *Pld3* mRNA 양은 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1.02, p 값 0.01315로 유의하게 감소되었다.

3-14. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 근육조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12 주 동안 투여한 후 희생시켜 가자미근조직 전사체를 분석하여 지질대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 당뇨군과 비교한 결과는 Table 12와 같다. 당뇨+카테킨군의 가자미근조직 *Pla2g2a*, *Lpl*, *Pld3*, *Acsf2*, *Acad11*, *Acaa2*, *Hsd17b10* 및 *Echs1* mRNA 양을 당뇨군과 비교한

결과 당뇨군+카테킨군에서 Pla2g2a mRNA 양이 당뇨군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1.036 , p 값 0.00175 로 유의하게 감소되었고, 다른 유전자의 변화는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-15. 당뇨군의 내장지방조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12 주후에 흰쥐를 희생시켜 내장지방조직 전사체를 분석하여 지질대사 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는 Table 14와 같다. 당뇨군 내장지방조직 Fasn, Acacb, Acaca, long-chain fatty acid transport protein 1(Slc27a1), long-chain fatty acid transport protein 3 precursor(Slc27a3), hormone-sensitive lipase(Lipe) 및 Pla2g2a mRNA 양을 대조군과 비교하였다. 당뇨군의 내장지방조직에서 Fasn 과 Slc27a1 mRNA 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1 이하, p 값 0.05 이하로 유의하게 감소되었고, Acacb는 $\log_2(FC)$ 값 1.96 , p 값 0.02295 로 나타나서 유의하게 증가됨을 보여주고 있다.

3-16. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 지질대사 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12 주 동안 투여한 후 희생시켜 내장지방조직 전사체를 분석하여 지질대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 당뇨군과 비교한 결과는 Table 15 와 같다. 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 Fasn, Acacb, Acaca, Slc27a1, Slc27a3, Lipe 및 Pla2g2a mRNA 양을 당뇨군과 비교한 결과 당뇨군+카테킨군에서 Pla2g2a mRNA 양은 $\log_2(FC)$ 값 -2.01 , p 값 0.00035 로 유의하게 감소되었고, 다른 효소들은 두군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3-17. 당뇨병군의 간조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12주후에 흰쥐를 희생시켜 간 조직 전사체를 분석하여 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는 Table 16 과 같다. 당뇨병군 간조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 insulin receptor preproprotein(*Insr*), insulin receptor substrate 1(*Irs1*), insulin receptor substrate 2(*Irs2*), insulin receptor substrate 3(*Irs3*) mRNA 량을 대조군과 비교하였다. 당뇨병군의 간 조직에서 *Insr* mRNA 량이 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1.15, p 값 0.0466 으로 나타나서 유의하게 감소되었고, *Irs3* mRNA 량이 대조군의 간조직에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 2.60, p 값 0.01805 로 유의하게 증가됨을 보여주고 있다. 당뇨병군의 간 조직 *Irs1*과 *Irs2* mRNA 량은 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-18. 당뇨병군과 당뇨+카테킨군의 간 조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12주 동안 투여한 후 희생시켜 간 조직 전사체를 분석하여 인슐린 신호전달경로 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 17과 같다. 당뇨+카테킨군의 간 조직 *Insr*, *Irs1*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA량을 당뇨병군과 비교한 결과 당뇨병군+카테킨군에서 *Irs1*과 *Irs2* mRNA 량은 당뇨병군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상, p 값이 0.05 이하로 유의하게 증가되었고, *Irs3* mRNA 량이 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -2.02, p값 0.01175 로 유의하게 감소됨을 보여주고 있다. 당뇨병군의 간 조직 *Irs2* mRNA 량은 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 0.13, p값 0.80385 로 나타나서 유의성이 없었다.

3-19. 당뇨군의 근육조직 인슐린 신호전달경로 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12주후에 흰쥐를 희생시켜 가자미근조직 전사체를 분석하여 인슐린 신호전달경로 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는 Table 18과 같다. 당뇨군 가자미근조직 *Irsr*, *Irs1*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA 양을 대조군과 비교하였다. 당뇨군에서 *Irs1* mRNA 양이 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -0.94 , p 값 0.04735 로 유의하게 감소되었고, *Irsr*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA 양은 대조군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-20. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 근육조직 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12주 동안 투여한 후 희생시켜 가자미근조직 전사체를 분석하여 인슐린 신호전달경로 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 당뇨군과 비교한 결과는 Table 19와 같다. 당뇨+카테킨군의 가자미근조직 *Irsr*, *Irs1*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA 양을 당뇨군과 비교한 결과 당뇨군+카테킨군에서 *Irs1* mRNA 양이 당뇨군에 비하여 $\log_2(FC)$ 값 1.15 , p 값 0.004 로 유의하게 증가되었고, 다른 유전자의 변화는 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p 값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-21. 당뇨군의 내장지방조직 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화

당뇨병 발생 12 주 후에 흰쥐를 희생시켜 내장지방조직 전사체를 분석하여 인슐린 신호전달경로 관련 유전자의 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과는

Table 20 과 같다. 당뇨군 내장지방조직 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 량을 대조군과 비교하였다. 당뇨군에서 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 량은 대조군과 비교하면 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p값 0.05 이상으로 나타나서 유의성이 없었다.

3-22. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 내장지방조직 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화

카테킨을 당뇨병흰쥐에 12주 동안 투여한 후 희생시켜 내장지방조직 전사체를 분석하여 인슐린 신호전달경로 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 당뇨군과 비교한 결과는 Table 21과 같다. 당뇨+카테킨군의 내장지방 조직 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 량을 당뇨군과 비교하였다. 당뇨군+카테킨군과 당뇨군의 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 량을 비교한 결과 $\log_2(FC)$ 값 -1 이상 1 이하, p값 0.05 이상으로 나타나서 두군사이에 유의한 차이가 없었다.

4. 고 찰

본 연구결과 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 투여하면 혈액의 증가된 혈당과 중성 지질량이 감소되는 것으로 나타났다. 실험동물에서 당뇨병을 유발시키는 물질로서 스트렙토조토신이 많이 이용되고 있는데, 스트렙토조토신은 췌장의 베타세포를 손상시켜서 제1형 당뇨병과 유사한 증상을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신 투여로 당뇨병이 유도된 흰쥐는 스트렙토조토신을 투여하지 않은 대조군을 비교한 결과, 1일 식이섭취량 46% 증가, 공복혈당 약 117% 증가 및 중성지질량이 117% 증가되었고, 혈청 인슐린의 양은 변화가 없었으나 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR은 약 111% 높게 나타나 제 2형 당뇨병과 유사한 질환이 유발된 것으로 생각된다. 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신으로 제 2형 당뇨병과 유사한 형태의 당뇨병이 유도된다고 하였는데(23,24), 본 실험에서 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신 투여 흰쥐에서 혈당은 증가되나 혈청 인슐린은 감소되지 않는 제 2형 당뇨병과 유사한 형태의 당뇨병이 발생되었다. 제 2형 당뇨병의 발병기전에 대하여는 많은 논란이 있으나, 인슐린 저항성, 인슐린 작용의 결함 및 손상된 β -세포 기능이 주요 요인으로 알려져 있다(25).

고혈당은 당뇨병의 발생 및 당뇨병 합병증 발생과도 밀접한 연관이 있기 때문에 고혈당의 조절은 당뇨병의 치료에 매우 중요한 요소이다. 본 연구는 당뇨병 혈당조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 카테킨을 당뇨흰쥐에 투여하면서 12주까지 혈당을 측정된 결과 공복혈당이 당뇨군에 비하여 2주, 4주, 8주 및 12주에 8%, 13%, 15% 및 18% 가 각각 감소되어 카테킨의 혈당감소 효과를 보여주고 있다.

혈청 BUN과 creatinine 양은 신장 기능을 나타내는 지표로서 당뇨병성 신증이 나타나면 증가되는 것으로 알려져 있다(26). 본 연구에서 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 12주 동안 경구투여한후 혈청 BUN과 creatinine 값을 측정된 결과 혈청 BUN 값은 당뇨군보다 35% 정도가 감소되었고, 혈청 creatinine 값은

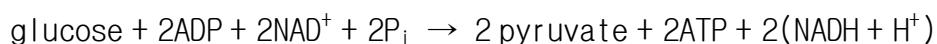
당뇨군보다 33% 가 감소되어 카테킨투여 당뇨 흰쥐에서 당뇨군보다 신장손상이 더 작은 것으로 추측된다. Yamabe 등(27)은 당뇨병 흰쥐에 EGCG를 투여하면 creatinine과 BUN 값이 유의하게 감소되었다고 하여 본 실험결과와 유사하였다. 당뇨병에서 고혈당은 유리기 생성이 증가되어 산화 스트레스를 유발할 수 있는데, 산화 스트레스의 증가는 당뇨병성 합병증 발생과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(28). 따라서 본 연구에서 당뇨쥐에 카테킨 투여로 신장손상이 감소는 카테킨 투여로 인한 고혈당의 개선과 연관이 있는 것으로 추정된다.

혈당의 항상성은 포도당의 공급과 사용 경로의 엄격한 통제에 의해서 유지된다(29). 혈액 포도당의 공급은 식사 등에 의한 방법으로 외부에서 공급하는 외인적 방법과 간이나 신장 등에서 포도당을 생합성하여 공급하는 내인적인 방법이 있고, 혈액 포도당의 사용은 조직에서 해당경로에 의해서 에너지원으로 이용하는 방법과 지방 생합성에 이용하는 방법 등이 있다(29). 식사 후, 탄수화물은 소화과정을 거쳐서 단당류로 전환되어 소장 상피세포에서 흡수되어 간문맥의 혈당이 증가한다. 문맥에서 포도당이 증가하면 GLUT2에 의해 포도당이 대량으로 간세포내로 이동되어 글루코키나제(glucokinase)에 의해 glucose-6-phosphate로 전환되어 글리코겐으로 합성되고, 나머지는 지방산으로 합성되어 혈당을 낮추어 항상성을 유지하게 된다(30). 또한 혈당이 증가하면 근육조직에서 글리코겐 합성과 포도당 에너지원으로 사용이 일어나며, 지방조직에서는 지방산 합성이 증가하게 된다. 따라서 혈당이 증가하면 간과 근육 및 지방조직의 포도당 사용량이 증가하여 혈당이 낮아지게 된다. 반면에 혈당이 감소되면 간세포에서 포도당을 생합성하여 혈액에 공급하여 혈당을 높이는데, 이때 포도당 합성의 재료로 이용되는 물질은 글리코겐, 젖산, 아미노산 및 글리세롤이 이용될 수 있다(31). 따라서 간, 근육 및 지방조직의 포도당 대사 및 지방산 합성 경로의 조절은 혈당의 항상성 유지에 매우 중요한 요소이다. 본 실험에서 당뇨흰쥐에 카테킨을 투여하여 혈당의 개선효과가 있어서 혈당의 항상성 유지에 관여하는 간, 근육 및 지방조직의 포

도당 대사 및 지방산 합성 경로에 관여하는 효소의 발현량을 전사체 (transcriptome) 분석을 통하여 관찰하였다. 카테킨은 당질의 소화 흡수를 억제하고, 당신생을 억제하며, 근육조직과 지방조직에서 당의 사용을 촉진시키는 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있어서(32), 이러한 기전을 통해 공복 혈당의 조절에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

전사체란 조직이나 세포에서 어떤 시점에 발현되는 유전자의 전체 mRNA의 모음으로, 전사체 분석을 통해 정상 세포와 비정상 세포 간에 발현되는 mRNA의 차이를 분석하면 질병과 관련한 유전자의 발현변화를 알 수 있다(20).

본 실험에서 당뇨병 흰쥐의 간 포도당대사 및 글리코겐 대사관련 유전자에 대한 전사체 분석으로 알아보았다. 당뇨병 발생 12주일 후 흰쥐를 희생시켜 간조직을 절제하고 total RNA를 분리하여 전사체를 분석하여 포도당 대사관련 효소 Gck, Pfk1, Aldob, Pkm, Pdk2, Pdp2 및 Pdk4 mRNA 와 글리코겐 대사 관련 효소 Pygl와 Phkb mRNA 량을 비교한 결과, 당뇨병에서 대조군에 비하여 간조직 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 량이 유의(p<0.05)하게 감소됨을 보여주고 있고, 다른 유전자의 발현 변화는 유의성이 없었다. 포도당이 10단계의 반응을 거쳐서 피루브산과 ATP로 전환되는 과정을 해당과정이라 하며, 해당 과정을 반응식으로 표시하면 다음과 같다.



해당과정에는 헥소오스키나아제(Hexokinase), 포스포글루코오스 이성질화효소(phosphoglucose isomerase), 포스포프룩토키나아제(phosphofructokinase), 알돌라아제(aldolase), 글리세르알데히드 3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 포스포글리세르산키나아제(phosphoglycerate kinase), 포스포글리세르뮤타제(phosphoglyceromutase), 에놀레이스(enolase) 및 피루브산키나아제(pyruvate kinase)가 관여하여 포도당을 피루브산으로 전환시킨다(33).

Gck는 헥소 키나제의 한 종류(hexokinase family)로서 포도당 대사 경로의 첫 단계인 포도당을 포도당-6-포스페이트로 전환시키는 반응을 촉진한다. 다른 형태의 헥소키나제와 대조적으로, 이 효소는 글루코스-6-포스페이트에 의해 억제되지 않으며, 글루코스가 증가되면 활성을 유지한다. 이 효소는 췌장 및 간에서 조직 특이적 발현을 하며, 췌장에서 포도당 자극에 의한 인슐린 분비에 관여하고, 간에서는 글리코겐 합성에 중요한 역할을 한다(34). Gck 유전자의 돌연변이는 효소활성이 저하되어 당뇨병 및 고인슐린 혈증을 유발할 수 있다(35). 본 실험에서도 당뇨병 흰쥐의 간 Gck 발현량이 감소되어 있는데, 이는 혈당의 증가와 연관이 있는 것으로 추측된다.

Pyruvate dehydrogenase complex(PDC)는 구연산 주기(TCA cycle), 지방 생합성 및 콜레스테롤 생합성과 같은 주요 대사과정에 필요한 탄소원을 제공하는 중심적인 역할을 한다(36). 포유류 PDC 활성은 피루베이트 데하이드로게나제 키나제(pyruvate dehydrogenase kinase: PDK) 및 피루 베이트 데하이드로게나제 포스파타제(pyruvate dehydrogenase phosphatase:PDP)에 의해 촉매되는 인산화(phosphorylation) 및 탈인산화(dephosphorylation) 반응을 통해서 효소활성이 조절되고 있다(36). PDK 는 4가지(PDK1-4)의 동종효소가 있으며 이들은 각 조직에 따라서 발현이 다르게 일어나고 있다(36). PDK2 및 PDK4는 신체의 대부분의 주요 조직 및 기관에서 발현되는 것으로 보이고, PDK1은 심장 및 췌장 소도(islet)에서 발현되고, PDK2 와 PDK4는 신체의 대부분의 조직에서 발현되며, PDK3은 신장, 뇌 및 고환에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있다(37). PDK4는 장기적인 당뇨병, 갑상선 기능 항진증 및 기아 등에 의해서 조직에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다(38). PDP는 PDP1과 PDP2 두 가지 동종효소가 알려져 있는데, 이들은 모두 Mg²⁺-dependent mitochondrial serine/threonine phosphoprotein phosphatases이며 protein phosphatase 2C family 이다(38). PDP1은 Ca²⁺-sensitive isoform 이고 PDP2는 Ca²⁺-insensitive isoform 이다. PDP1은 heart, brain 및

testis 에서 유전자 발현이 많고, PDP2은 kidney, liver, heart 및 brain 에서 유전자 발현이 많다(39). 본 실험에서 당뇨병 흰쥐의 간 Pdp2 발현량이 감소되어 있는데, 이는 PDC 활성을 감소시켜서 혈당의 증가와 연관이 있는 것으로 추측된다.

글리코겐 인산화효소(glycogen phosphorylase)를 활성화 시키는 phosphorylase kinase (Phk)는 간과 근육에서 발현이 많은 효소로서 알파(α), 베타(β), 감마(γ) 및 델타(δ) subunits 로 구성되어 있는데, 감마 subunit은 catalytic subunit 이고, 알파, 베타 및 델타 subunits 는 regulatory subunits 이다. Phkb는 Phk 베타 subunit 이다(40). 근육과 간세포에 저장되어있는 글리코겐은 포도당이 필요할 때 glycogen phosphorylase 에 의해서 빠르게 분해 될 수 있다. 일반적으로, Phk는 가역적 인산화에 의해 allosteric regulation 된다. 호르몬, 신경 자극 및 근육 수축 등은 칼슘 이온의 방출을 자극하고, 칼슘이온이 Phk δ 서브 유닛에 결합하여 부분적으로 활성화시키는 역할을 한다. β 및 α 서브 유닛이 protein kinase A에 의해 인산화되고 델타 서브유닛에 칼슘 이온에 결합되면 Phk는 완전하게 활성화된다(41). 본 실험에서 당뇨병 흰쥐의 간 Phkb 발현량이 감소되어 있는데, 이는 glycogen phosphorylase 활성을 감소시켜서 혈당의 증가와 연관이 있는 것으로 추측된다.

카테킨을 12주 동안 경구 투여한 당뇨병 흰쥐의 간 조직 전사체를 분석하여 포도당대사 관련 유전자의 발현량을 비교한 결과 당뇨군에 비하여 당뇨군+카테킨군 간 조직에서 Gck, Pdk4 및 Phkb mRNA 량이 유의($P<0.05$)하게 증가됨을 보여 주었다. 당뇨군에서 대조군에 비하여 간 조직 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 량이 감소였는데, 카테킨+ 당뇨군 간 조직 Gck, Pdk4 및 Phkb mRNA 량이 증가되어 카테킨 투여로 간조직 Gck, Pdk4 및 Phkb 발현량이 증가된 것으로 추측된다. Gck와 Pdk4는 포도당 분해를 촉진하기 때문에 당뇨흰쥐에서 카테킨에 의한 간 조직 Gck와 Pdk4 발현증가는 혈당량의 감소와 연관이 있을 것으로 생각된다.

가자미근(soleus muscle)은 인간과 포유동물에서 다리의 종아리(calf) 부분을 구성하며 보행에 관여하는 강력한 골격근이다(42). 골격근은 포도당 농도가 높을 때 대사가 일어나기 때문에 고혈당에서 근육운동에 의한 포도당 대사의 증가는 혈당조절에 중요한 요소이다. 본 실험에서 당뇨병 흰쥐의 가자미근 포도당대사 및 글리코겐 대사관련 유전자에 대한 전사체 분석으로 알아보았다. 당뇨병 발생 12주일 후 흰쥐를 희생시켜 가자미근을 절제하고 total RNA를 분리하여 전사체를 분석하여 포도당 대사관련 효소 Hk1, Pfk, Aldob, Eno3, Pkm 및 Pygm mRNA 양을 대조군과 비교한 결과 fructose 1,6-bisphosphate를 분해시키는 효소인 Aldob mRNA 양이 유의하게 감소되었고, 다른 유전자의 발현은 유의한 차이가 없었다. 당뇨+카테킨군의 가자미근 조직 Hk1, Pfk, Aldob, Eno3, Pkm 및 Pygm mRNA 양을 당뇨군과 비교한 결과 Aldob mRNA 양이 당뇨군에 비하여 유의하게 증가되었고, 다른 유전자의 발현은 유의한 차이가 없었다. Aldob는 주로 간조직에서 발현되는 효소로서 근육 조직에서는 발현량이 적기 때문에 당뇨군 근육에서 발현량이 감소되어도 포도당대사에 미치는 영향을 크지 않을 것으로 생각되어 근육조직에서 당뇨군에서 포도당대사 관련 유전자의 발현변화에 의한 포도당대사의 영향은 적을 것으로 추측된다.

내장지방은 복강 내에 저장되는 체지방으로 간이나 내장 등 복강 내 장기 주위에 저장된다. 내장지방은 호르몬의 기능에 영향을 미치기 때문에 활성지방(active fat)이라고도 하며 제 2 형 당뇨병과도 관련이 있다(43). 내장지방조직 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량 차이를 비교한 결과 당뇨군의 내장지방조직에서 Pfk, Eno3 및 Pgam2 발현은 증가되었고, Aldob와 Pklr 발현은 감소되었다. 당뇨군+카테킨군의 내장지방조직에서 Pfk, Eno3 및 Pgam2 발현량은 당뇨군에 비하여 감소되었고, Aldob는 증가되어서 당뇨병 발생으로 변화된 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량 변화가 카테킨 투여로 일부 회복되는 것으로 나타났다. 내장지방조직은 혈당이 증가하면 포도당을 분해하

여 지방산을 합성하는 경로가 활성화되는데, 당뇨병 흰쥐에서 포도당을 분해하는 경로에 관여하는 효소인 Pfk_m, Eno3 및 Pgam2 유전자 발현량이 증가하나, 해당과정의 마지막 단계를 촉매하는 Pk1r 발현량이 감소되어 해당과정에 의한 포도당 분해는 오히려 감소되었을 것으로 생각된다. 이상의 실험결과 당뇨병 흰쥐의 포도당대사 관련 유전자의 RNA 발현량은 간 조직에서는 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 량이 감소되고, 근육조직에서는 Aldob mRNA 량이 감소되었으며, 내장지방조직에서는 Pfk_m, Eno3 및 Pgam2 발현은 증가되었고, Aldob와 Pk1r 발현은 감소되었는데, 간 조직 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 량이 감소에 의한 포도당 분해는 감소가 혈당의 증가와 밀접한 연관이 있을 것으로 추측되고 근육조직은 포도당대사에 미치는 영향이 적은 것으로 추측된다. 또한 당뇨군+카테킨군의 간 조직에서 당뇨군에 비하여 Gck, Pdk4 및 Phkb mRNA 량이 증가되어 당뇨병의 인하여 감소되었던 효소의 발현억제가 어느 정도 회복되었는데, 이는 고혈당의 회복과도 연관이 있을 것으로 생각된다.

혈당이 증가하면 간과 지방조직에서는 포도당을 분해하여 지방산을 합성하여 혈당이 낮아진다. 당질은 해당과정을 통해서 피루브산으로 분해된 후 pyruvate dehydrogenase에 의해서 acetyl-CoA로 전환된 후 malonyl CoA를 거쳐서 지방산으로 합성된다. Acetyl-CoA는 acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 촉매작용으로 malonyl-CoA로 전환되고, malonyl-CoA는 fatty acid synthetase (FAS)에 의해서 지방산으로 합성된다(44). 당뇨병이 지방대사 관련 효소 유전자발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 흰쥐의 간, 근육 및 지방조직에서 전사체 분석을 실시하였다. 당뇨병 발생 12주일 후 흰쥐 간 조직 전사체 분석을 실시하여 지방대사 관련 효소 Fasn, Acaca, Acacb, Acsf2, Acss3, Acadl, Echs1, Hsd17b10 및 Acaa2 mRNA 량을 비교한 결과 당뇨군에서 대조군에 비하여 간 조직 Acsf2 mRNA 량이 유의(p<0.05)하게 증가되었고, Acss3 mRNA 유의(p<0.05)하게 감소됨을 보여주고 있고, 다른 유전자의 발현 변화는 유의성이 없었다. 본 실험결과 당뇨군의 Acaca와 Acacb 유전자 발현

은 대조군과 차이가 없어서 간 조직에서 ACC 량 차이에 의한 지방 합성량의 변화는 없을 것으로 추측된다. 지방산은 acyl CoA synthetase에 의해서 Fatty acyl-CoA 전환된 후 β 산화가 일어나서 acetyl-CoA 로 전환된 후 TCA cycle에서 완전 산화된다. 지방산 β 산화는 fatty acyl-CoA가 acyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase, hydroxy acyl-CoA dehydrogenase 및 thiolase 등 4단계의 효소반응에 의한 acetyl-CoA를 생산하는 과정이다(45). 본 실험에서 당뇨군에서 간조직 지방산을 활성화시키는 Acsf2 와 Acss3 mRNA 량은 변화되었으나, 지방산 β 산화에 관여하는 효소의 유전자 발현의 차이는 없어서 당뇨병 발생에 의한 간조직 지방산의 대사관련 효소발현의 차이에 의한 지방산 β 산화의 변화는 없을 것으로 추측된다. 당뇨군+카테킨군의 간조직에서 Acaca, Acacb 및 Acss3 mRNA 량은 당뇨군에 비하여 유의하게 증가되었고, Acsf2 mRNA 량은 유의하게 감소되어 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 투여하면 간조직에서 지방산 합성이 증가되고, 지방산 β 산화는 영향이 없는 것으로 추측된다.

당뇨군의 가자미근조직 Pla2g2a, Lpl, Acsf2, Acad11 및 Acaa2 mRNA 량이 대조군에 비하여 유의하게 증가되었고, Pld3 mRNA 량은 감소되었다. 근육세포에 지방공급을 증가시킬 수 있는 LPI, 지방산 활성화에 관여하는 Acsf2 및 지방산 β 산화에 관여하는 Acad11 및 Acaa2 mRNA 량이 증가되어 당뇨군은 대조군에 비하여 지방산의 β 산화가 증가 될 것으로 추측된다. 당뇨군+카테킨군의 가자미근조직에서 Pla2g2a mRNA 량이 당뇨군에 비하여 감소되고, 다른 유전자의 발현 변화는 유의성이 없어서 당뇨병 흰쥐에 카테킨투여로 인하여 근육 지방산 산화 관련 효소의 유전자 발현에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 추측된다.

당뇨군의 내장지방조직 지질대사 관련 효소의 전사체 조사결과 Acacb mRNA 량이 대조군에 비하여 유의하게 증가되었고, Fasn 과 Slc27a1 mRNA 량은 감소되었다. 당뇨군 내장지방조직에서 malonyl-CoA 합성에 관여하는 Acacb

mRNA 량이 증가되나, 지방산합성효소인 Fasn mRNA 량이 감소되어 당뇨군은 대조군에 비하여 지방산의 합성은 감소될 것으로 추측된다. 당뇨군+카테킨군의 내장지방조직에서 Pla2g2a mRNA 량이 당뇨군에 비하여 감소되고, 다른 유전자의 발현 변화는 유의성이 없어서 당뇨병 흰쥐에 카테킨투여로 인하여 내장지방조직 지방산 산화 관련 효소의 유전자 발현에 미치는 영향은 거의 없어서 내장지방조직 지방산대사에 미치는 카테킨의 영향은 적을 것으로 추측된다. 이상의 실험결과 당뇨병 흰쥐의 지방산대사 관련 유전자의 RNA 발현량은 간 조직에서는 Acsf2 와 Acss3 mRNA 량은 변화되고, 근육조직에서는 Pla2g2a, Lpl, Acsf2, Acad11 및 Acaa2 mRNA 량이 대조군에 비하여 증가되었고, Pld3 mRNA 량은 감소되었으며, 내장지방조직에서는 Acacb mRNA 량이 증가되었고, Fasn 과 Slc27a1 mRNA 량은 감소되어서, 당뇨병으로 인하여 간 조직 지방의 합성이나 β 산화에 미치는 영향은 적었고, 근육조직은 지방산 β 산화가 증가되며, 내장지방조직에서는 지방산합성이나 β 산화에 미치는 당뇨병의 영향이 적은 것으로 추측된다. 또한 당뇨군+카테킨군의 간 조직에서 당뇨군에 비하여 간 조직에서 Acaca, Acacb 및 Acss3 mRNA 량은 증가되어 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 투여하면 간 조직에서 지방산 합성이 증가되나, 지방산 β 산화는 영향이 없으며, 근육 지방산 산화 관련 효소의 유전자 발현에 미치는 영향은 거의 없으며, 내장지방조직 지방산 산화 관련 효소의 유전자 발현에 미치는 카테킨의 영향도 없어서 카테킨은 간 조직에 작용하여 지방산 합성을 증가 시키는 역할을 하는 것으로 추측된다.

인슐린 신호전달 경로는 인슐린이 지방 및 근육 세포내로 포도당 이동을 증가시키고, 간세포에서 포도당 생합성을 감소시켜서 혈당을 낮추어 포도당 항상성을 유지하는 경로이다(46). 탄수화물이 소화 및 흡수되어 혈당이 증가하면 체장은 혈당 농도의 상승을 감지하고 혈류에서 포도당의 배출을 촉진하기 위해 인슐린을 방출한다. 인슐린은 인슐린 수용체에 결합하여 세포내에서 포도당의 사용 또는 저장을 촉진하는 일련의 세포 과정으로 이어진다. 인슐린 수용체는 α -subunit와 β -subunit로 구성되어 있는데, 이들은 모두 Insr

mRNA로부터 합성된 펩티드로부터 만들어진다. 인슐린 수용체 α -subunit에 인슐린이 결합되면 β -subunit가 활성화되어 IRS를 활성화시킨다. 활성화된 IRS는 다음 단계로서 mitogen-activated protein kinase(MAP-K)와 phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K)가 활성화되고, PI-3K는 글리코겐, 지방산 및 단백질 합성을 증가시키는 역할을 한다(46).

당뇨병이 인슐린 신호전달 경로 관련 유전자발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 흰쥐의 간, 근육 및 지방조직에서 전사체 분석을 실시하였다. 당뇨병 발생 12 주일 후 흰쥐 간 조직 전사체 분석을 실시하여 인슐린 신호전달 경로 관련 효소 *Irsr*, *Irs1*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA 양을 비교한 결과 당뇨군에서 대조군에 비하여 간 조직 *Irs3* mRNA 양이 유의($p < 0.05$)하게 증가되었고, *Irsr* mRNA 유의($p < 0.05$)하게 감소됨을 보여주고 있고, *Irs1*과 *Irs2* mRNA 양 변화는 유의성이 없었다. 본 연구결과 당뇨군의 간 조직에서 *Irsr* mRNA 양이 감소되고, *Irs3* mRNA 양이 증가되었는데, *Irsr* mRNA 양 감소로 인하여 인슐린 반응이 감소될 것으로 추측된다. 간 조직에서 인슐린반응 감소는 글리코겐 합성효소와 글리코겐 분해효소의 활성이 감소되므로 식후 혈당의 증가와 연관이 있을 것으로 추측된다. Brüning 등은 *Irsr*과 *Irs1*의 유전자 결합이 제 2형 당뇨병의 발병과 밀접한 연관이 있다고 하였다(47). 당뇨+카테킨군의 간 조직 *Irsr*, *Irs1*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA 양을 당뇨군과 비교한 결과 당뇨군+카테킨군의 간 조직에서 *Irs1*과 *Irs2* mRNA 양은 당뇨군에 비하여 증가되었고, *Irs3* mRNA 양이 감소되었는데, 인슐린 신호전달과정에서 *Irs1*과 *Irs2*의 작용이 *Irs3* 보다 강하기 때문에 카테킨은 인슐린 작용에 의한 반응을 증가시키는 작용을 할 것으로 추측된다. 또한 가자미근조직 *Irsr*, *Irs1*, *Irs2* 및 *Irs3* mRNA 양을 비교한 결과 당뇨군에서 *Irs1* mRNA 양이 대조군에 비하여 감소되었고, 당뇨군+카테킨군에서 *Irs1* mRNA 양이 당뇨군에 비하여 유의하게 증가되었다. 근육조직 *Irs1*은 근육조직의 GLUT4의 기능에 중요한 작용을 하기 때문에 본 실험에서 당뇨군의 근육조직 *Irs1* mRNA 양 감소는 혈

당의 증가와 밀접한 연관이 있으며, 당뇨군+카테킨군에서 Irs1 mRNA 양이 증가되어 카테킨은 근육조직에서 Irs1 발현량을 증가 시키는 작용이 있고, 이는 혈당개선과 연관이 있는 것으로 추측된다. 내장지방조직 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 양을 비교한 결과 대조군, 당뇨군 및 당뇨군+카테킨군 사이에 유의한 변화가 없었다. 이상의 실험결과 인슐린 신호전달 경로에 관여하는 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 양을 비교한 결과 당뇨군에서 간조직에서 Irsr mRNA 양이 감소되고, 근육조직 Irs1 mRNA 양이 감소되었고, 내장조직에서는 이들 유전자의 발현량 차이가 없었고, 당뇨군+카테킨군에서 간조직에서 Irsr mRNA 양과 근육조직 Irs1 mRNA 양이 증가되어 카테킨은 간조직과 근육조직의 인슐린 신호전달 경로를 개선시키는 작용이 있는 것으로 추측된다.

이상의 실험결과 카테킨이 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 투여하면 혈당을 감소시키는 효과가 있고, 간 조직에서 당뇨병으로 인하여 감소된 포도당대사 관련효소 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 양과 인슐린 신호전달 관련 유전자 Irsr mRNA 양이 카테킨 투여로 회복되었고, 근육조직 Irs1 mRNA 양이 증가되어 카테킨은 강의 포도당 대사관련효소의 유전자 발현과 인슐린 신호전달관련 단백질의 발현과 근육조직의 인슐린 신호전달 관련 단백질의 발현을 증가시켜서 고혈당 개선 작용을 하는 것으로 추측된다. 카테킨의 유전자 발현에 미치는 정확한 작용기전과 이의 기능성 물질로서 이용 가능성에 대하여는 추후 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

5. 요약

당뇨병환자에서 지속적인 고혈당은 신장 기능저하, 혈관손상, 망막손상, 말초신경병증 등 다양한 합병증을 유발할 수 있다. 당뇨병 합병증은 삶의 질을 현저히 저하시키기 때문에 이의 진행을 예방하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 천연물에 대한 탐색이 이어지고 있다. 폴리페놀은 페놀링 구조를 2개 이상 가진 물질로서 식물에 많이 포함되어 있으며 항산화 작용, 항암작용, 항염증작용 등 여러 가지 생리활성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 차에 많이 포함되어 있는 폴리페놀류인 카테킨은 생체실험에서 고혈당을 개선하는 항 당뇨 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

실험목적: 본 연구는 카테킨이 당뇨병의 지질 및 당질대사에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간, 근육 및 지방조직의 전사체를 조사하여 비교 분석하였다.

실험방법 : SD 종 흰쥐에 고지방식이와 스트렙토조토신을 이용하여 당뇨병을 유발하였다. 실험군은 대조군, 당뇨군 및 당뇨+카테킨군으로 분류하고, 대조군과 당뇨군에는 수돗물을 음용수로, 당뇨+카테킨군은 0.1% 카테킨을 함유한 수돗물을 음용수로 12주 동안 공급하였다. 혈액에 혈당량, BUN 과 creatinine 양을 측정하였고, 간, 근육 및 내장지방에서 전사체조사를 실시하여 포도당대사 관련 효소, 지질대사 관련 효소 및 인슐린 신호전달 경로관련 단백질의 유전자 발현량의 비교 하였다.

실험결과: 공복혈당은 대조군과 당뇨군에서 실험시작 때에 비하여 12주까지 유의한 변화를 나타내지 않았다. 당뇨+카테킨군의 공복혈당은 당뇨군에 비하여 2주, 4주, 8주 및 12주에 8%, 13%, 15% 및 18%가 각각 감소되어 카테킨이 혈당감소 효과가 있는 것으로 나타났다. 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 12주 동안 경구투여한후 혈청 BUN과 creatinine 양을 측정한 결과 당뇨군보다 혈청 BUN 양은 35%, 혈청 creatinine 양은 33% 가 각각 감소 되었다. 당뇨병

흰쥐의 간 조직, 가자미근 및 내장지방조직 전사체를 조사하여 포도당 대사 관련 유전자, 지방대사관련 유전자 및 인슐린신호 전달관련 단백질의 mRNA 발현량은 비교하였다. 포도당 대사 관련 유전자는 대조군에 비하여 당뇨군의 간 조직 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 양이 감소되고, 근육조직 Aldob mRNA 양이 감소되었으며, 내장지방조직 Pfkml, Eno3 및 Pgam2 발현은 증가되었고, Aldob 와 Pk1r 발현은 감소되었다. 또한 당뇨군에 비하여 당뇨군+카테킨군의 간 조직 Gck, Pdk4 및 Phkb mRNA 양이 증가되었다.

지방산대사 관련 유전자는 대조군에 비하여 당뇨군의 간 조직 Acsf2 와 Acss3 mRNA 양은 변화되고, 근육조직에서는 Pla2g2a, Lpl, Acsf2, Acad11 및 Acaa2 mRNA 양이 대조군에 비하여 증가되었고, Pld3 mRNA 양은 감소되었으며, 내장지방조직에서는 Acacb mRNA 양이 증가되었고, Fasn 과 Slc27a1 mRNA 양은 감소되었다. 당뇨군에 비하여 당뇨군+카테킨군의 간 조직 Acaca, Acacb 및 Acss3 mRNA 양이 증가되었다. 인슐린 신호전달 경로에 관여하는 Irsr, Irs1, Irs2 및 Irs3 mRNA 양을 비교한 결과 당뇨군 간 조직의 Insr mRNA 양이 감소되고, 근육조직 Irs1 mRNA 양이 감소되었고, 내장조직에서는 이들 유전자의 발현량 차이가 없었다. 당뇨군에 비하여 당뇨군+카테킨군의 간 조직 Insr mRNA 양과 근육조직 Irs1 mRNA 양이 증가되었다.

결론 : 이상의 실험결과 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 투여하면 고혈당이 개선되는데, 간조직에서 당뇨병으로 인하여 감소된 Gck, Pdp2 및 Phkb mRNA 양과 Insr mRNA 양이 카테킨 투여로 회복되었고, 근육조직 Irs1 mRNA 양이 카테킨 투여로 증가되어 카테킨은 간 포도당 대사관련 효소와 간과 근육조직 인슐린 신호전달 경로 관련 단백질의 발현을 증가시키는 작용이 있으며 이는 카테킨의 고혈당 개선 작용과 연관이 있을 것으로 추측된다. 카테킨의 유전자 발현에 미치는 정확한 작용기전과 이의 기능성 물질로서 이용 가능성에 대하여는 추후 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

6. 참고 문헌

1. American Diabetes Association : Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*. 36:S67-S74. 2013
2. WHO : WHO Diabetes fact sheets. 2018. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> [accessed on September 22, 2019]
3. Stryer L. Glycolysis. In: Biochemistry (4th ed.). New York: W.H. Freeman and Company. pp 483-508. 1995
4. Lieberman M, Peet A. Formation and degradation of glycogen. In Marks, Basic Medical Biochemistry (5th ed), Philadelphia, Wolters Kluwer, pp 525-542. 2018.
5. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B : IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pr*. 138:271-281. 2018
6. Kim BY, Won JC, Lee JH, Kim HS, Park JH, Ha KH, Won KC, Kim DJ, Park KS : Diabetes fact sheets in korea, 2018: an appraisal of current status. *Diabetes Metab J*. 43:487-494. 2019
7. Akkati S, Sam KG, Tungha G : Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*. 51:796-804. 2011
8. Philippe J, Raccah D : Treating type 2 diabetes: how safe are current therapeutic agents? *Int J Clin Pract*. 63:321-332. 2009
9. Giacco F, Brownlee M : Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 107:1058-1070. 2010

10. Babu PV, Liu D, Gilbert ER : Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem.* 24:1777-1789. 2013
11. Madonna R, Balistreri CR, Geng YJ, De Caterina R : Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascul Pharmacol.* 90:1-7. 2017
12. Abdali D, Samson SE, Grover AK : How Effective Are Antioxidant Supplements in Obesity and Diabetes? *Med Princ Pract.* 24:201-215. 2015
13. Demain AL, Fang A : The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 69:1-39. 2000
14. Wikipedia : Flavonoid. Available at <https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid> [accessed on September 22, 2019]
14. Ross JA, Kasum CM : Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 22:19-34. 2002
15. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC : The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:693-704. 1997
16. Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, Tokimitsu I : Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:1459-1464. 2002
17. Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A : The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med.* 144:554-562. 2006
18. Yang JA, Choi JH, Rhee SJ : Effects of green tea catechin on

- phospholipase A2 activity and antithrombus in streptozotocin diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 45:337-346.1999
19. Wang Z, Gerstein M, Snyder M : RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 10:57-63. 2009
 20. Hart T, Komori HK, LaMere S, Podshivalova K, Salomon DR : Finding the active genes in deep RNA-seq gene expression studies. *BMC Genomics.* 14:778-785. 2013
 21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC : Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28:412-419. 1985
 22. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA : Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4:44-57. 2008
 23. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM : A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* 49:1390-1394. 2000
 24. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P : Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 52:313-320. 2005
 25. Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G : Accurate assessment of beta-cell function: The hyperbolic correction. *Diabetes.* 51:S212-S220. 2002
 26. Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA : Ellagic acid, an NF- κ B inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy. *Chem Biol Interact.* 219:64-75. 2014

27. N Yamabe, T Yokozawa, T Oya, M Kim : Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-*O*-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 319:228-236. 2006
28. Vincent A, Russell J, Low P, Feldman E : Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 25:612-28. 2004
29. Triplitt CL. Examining the mechanisms of glucose regulation. *Am J Manag Care.* 18:S4-S10. 2012
30. Agius L : Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J.* 414:1-18. 2008
31. Lieberman M, Peet A. Synthesis of fatty acid, triacylglycerols, and major membrane lipids. In Marks, Basic Medical Biochemistry (5th ed), Philadelphia, Wolters Kluwer, pp 631-665. 2018
32. Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F : Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord.* 12:43-51. 2013
33. Lieberman M, Peet A. Generation of adenosine triphosphate from glucose, fructose, and galactose: Glycolysis. In Marks, Basic Medical Biochemistry (5th ed), Philadelphia, Wolters Kluwer, pp 434-456. 2018
34. Li X, Shu YH, Xiang AH, Trigo E, Kuusisto J, Hartiala J, Swift AJ, Kawakubo M, Stringham HM, Bonnycastle LL, Lawrence JM, Laakso M, Allayee H, Buchanan TA, Watanabe RM : Additive effects of genetic variation in GCK and G6PC2 on insulin secretion and fasting glucose. *Diabetes.* 58:2946-2953. 2009
35. Heni M, Ketterer C, Hart LM, Ranta F, van Haeften TW, Eekhoff EM, Dekker JM, Boomsma DI, Nijpels G, Kramer MH, Diamant M,

- Simonis-Bik AM, Heine RJ, de Geus EJ, Schäfer SA, Machicao F, Ullrich S, Thamer C, Stefan N, Staiger H, Häring HU, Fritsche A : The impact of genetic variation in the G6PC2 gene on insulin secretion depends on glycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 95:E479-E484. 2010.
36. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM : Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J.* 358:69-77. 2001
37. Sugden MC, Holness MJ : Therapeutic potential of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases in the prevention of hyperglycaemia. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2:151-165. 2002
38. Huang B, Gudi R, Wu P, Harris RA, Hamilton J, Popov KM : Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA- derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J Biol Chem.* 273 17680-17688. 1998
39. Huang B, Wu P, Popov KM, Harris RA : Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes.* 52:1371-1376. 2003
40. Brushia R, Walsh D : Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Front Biosci.* 4:D618-D641. 1999
41. Thompson JA, Carlson GM :The regulatory α and β subunits of phosphorylase kinase directly interact with its substrate, glycogen phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 482:221-225. 2017

42. Hodgson JA, Finni T, Lai AM, Edgerton VR, Sinha S : Influence of structure on the tissue dynamics of the human soleus muscle observed in MRI studies during isometric contractions. *J Morphol.* 267:584-601. 2006
43. Tchernof A, Després JP : Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 93:359-404. 2013
44. Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC : Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann Rev Biochem.* 52:537-579. 1983
45. Houten SM, Wanders RJ : A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 33:469-477. 2010
46. Saltiel AR, Kahn CR : Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414:799-806. 2001
47. Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR : Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell.* 88:561-572. 1997

Table 1. Physical and biochemical parameters of experimental animals

Parameter	Control rats	Diabetic rats
Food intake(g/24h)	14.3 ± 1.9 ^a	20.9 ± 4.1 ^b
Body weight(g)	261.8 ± 15.7	269.2 ± 17.1
FBG ¹⁾ (mg/dL)	86.5 ± 10.1 ^a	187.3 ± 29.7 ^b
Plasma insulin(μU/mL)	8.5 ± 0.6	8.0 ± 0.6
HOMA-IR ²⁾	1.8 ± 0.3 ^a	3.8 ± 0.6 ^b
Triglyceride(mg/dL)	77.2 ± 6.5 ^a	163.3 ± 17.1 ^b

¹⁾FBG: fasting blood glucose.

²⁾HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a,b) within the same parameters are significantly different the level of p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 2. Effect of catechin on physical and biochemical parameters in experimental animals

Parameter	Control	DM ¹⁾	DM+CA ²⁾
Food intake(g/24h)	19.8 ± 3.1 ^a	29.2 ± 4.5 ^b	26.5 ± 3.9 ^b
Body weight(g)	305.2 ± 17.2	296.9 ± 18.9	301.7 ± 19.1
FBG(mg/dL)	88.7 ± 8.7 ^a	211.0 ± 20.7 ^c	171.3 ± 16.5 ^b
Plasma insulin(μU/mL)	8.0 ± 0.8	7.6 ± 0.8	7.7 ± 0.6
HOMA-IR	1.7 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.5 ^b	3.3 ± 0.5 ^b
Triglyceride(mg/dL)	78.7 ± 9.5 ^a	179.5 ± 17.2 ^c	135.7 ± 12.3 ^b

¹⁾DM: diabetes mellitus.

²⁾DM+CA : Diabetes mellitus+catechin ; diabetic rats treated with catechin(0.1% in drinking water) for 12 weeks. Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a-c) within the same parameters are significantly different the level of p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effects of catechin on blood urea nitrogen and creatinine in blood of diabetic rats

Groups	BUN ¹⁾ (mg/dL)	Creatinine(mg/dL)
Control	21.7 ± 4.1 ^a	0.35 ± 0.08 ^a
DM	79.5 ± 10.3 ^b	1.13 ± 0.15 ^b
DM+CA	51.1 ± 9.7 ^c	0.75 ± 0.10 ^a

¹⁾BUN: Blood urea nitrogen.

Rats were administered catechin for 12 weeks, the BUN and creatinine were determined after these treatments. DM: diabetes mellitus, DM+CA: diabetic rats treated with catechin (0.1% in drinking water). Values are mean ± SD (n=5). Values with different letters(a,b) within the same column are significantly different the level of p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 4. Select liver transcripts in control versus DM rats related to glucose metabolism

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Gck	32.77	14.29	-1.19	0.0327
Pfkl	22.63	31.48	0.47	0.4148
Aldob	3167.21	4362.65	0.46	0.4531
Pkm	7.30	10.09	0.46	0.4555
Pdk2	103.91	152.84	0.55	0.3592
Pdp2	8.25	3.47	-1.24	0.0442
Pdk4	10.56	9.46	-0.15	0.7997
Pygl	93.13	91.53	-0.02	0.9678
Phkb	4.67	1.22	-1.92	0.0092

RPKM : read per kilobase of transcript per million mapped reads, Gck : glucokinase isoform 2, Pfkl : ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type, Aldob : fructose-bisphosphate aldolase B, Pkm : pyruvate kinase PKM isoform M1, Pdk2 : pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2, Pdp2 : [Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 2, mitochondrial precursor, Pdk4 : [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial, Pygl : glycogen phosphorylase, liver form, Phkb : phosphorylase b kinase regulatory subunit beta,

Table 5. Select liver transcripts in DM versus DM+CA rats related to glucose metabolism

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Gck	13.66	68.41	2.32	0.0001
Pfkl	30.08	19.22	-0.64	0.1817
Aldob	4168.51	3314.27	-0.33	0.4953
Pkm	9.64	6.46	-0.57	0.3044
Pdk2	146.03	110.29	-0.40	0.3786
Pdp2	3.32	5.63	0.76	0.2036
Pdk4	9.04	23.91	1.40	0.0124
Pygl	87.45	75.92	-0.20	0.6483
Phkb	1.17	3.31	1.49	0.0252

Gck : glucokinase isoform 2, Pfkl : ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type, Aldob fructose-bisphosphate aldolase B, Pkm : pyruvate kinase PKM isoform M1, Pdk2 : pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2, Pdp2 : [Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 2, mitochondrial precursor, Pdk4 : [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial, Pygl : glycogen phosphorylase, liver form, Phkb : phosphorylase b kinase regulatory subunit beta.

Table 6. Select soleus muscle transcripts in control versus DM rats related to glycolysis

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Hk1	1.10	1.29	0.22	0.6931
Pfkm	1429.70	1496.36	0.06	0.8932
Aldob	8.58	0.26	-5.02	0.0243
Eno3	7873.83	7937.29	0.01	0.9836
Pgam2	7942.26	9212.76	0.21	0.6789
Pkm	2424.94	2545.09	0.06	0.8888
Pygm	4488.66	5462.58	0.28	0.6037

Hk1 : hexokinase-1 isoform HK1-sb, Pfkm : ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type, Aldob : fructose-bisphosphate aldolase B, Eno3 : beta-enolase, Pkm : pyruvate kinase PKM isoform M1, Pygm : glycogen phosphorylase, muscle form.

Table 7. Select soleus muscle transcripts in DM versus DM+CA rats related to glycolysis

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Hk1	1.30	1.71	0.39	0.3563
Pfkm	1504.95	1402.54	-0.10	0.7827
Aldob	0.26	2.80	3.40	0.0116
Eno3	7945.19	7651.26	-0.10	0.7932
Pgam2	9265.63	7825.28	-0.24	0.5361
Pkm	2559.70	2199.23	-0.21	0.5647
Pygm	5493.93	3485.16	-0.65	0.1576

Hk1 : hexokinase-1 isoform HK1-sb, Pfkm : ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type, Aldob : fructose-bisphosphate aldolase B, Eno3 : beta-enolase, Pkm : pyruvate kinase PKM isoform M1, Pygm : glycogen phosphorylase, muscle form.

Table 8. Select visceral fat tissue transcripts in control versus DM rats related to glycolysis

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Hk1	34.98	19.77	-0.82	0.2615
Pfkm	13.20	278.47	4.39	0.0001
Aldob	286.39	2.75	-6.69	0.0004
Eno3	18.05	1239.64	6.10	0.0004
Pgam2	15.53	1193.95	6.26	0.0001
Pklr	8.99	0.08	-6.69	0.0012

Hk1 : hexokinase-1 isoform HK1-sb, Pfkm : ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type, Aldob : fructose-bisphosphate aldolase B, Eno3 : beta-enolase, Pgam2 : phosphoglycerate mutase 2, Pklr : pyruvate kinase PKLR.

Table 9. Select visceral fat tissue transcripts in DM versus DM+CA rats related to glycolysis

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Hk1	20.58	33.56	0.70	0.1756
Pfkm	289.87	12.97	-4.48	0.0001
Aldob	2.87	50.46	4.13	0.0002
Eno3	1290.39	7.51	-7.42	0.0001
Pgam2	1242.83	1.82	-9.40	0.0007
Pklr	0.09	0.63	2.81	0.2025

CAT : catechin, Hk1 : hexokinase-1 isoform HK1-sb, Pfkm : ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type, Aldob : fructose-bisphosphate aldolase B, Eno3 : beta-enolase, Pgam2 : phosphoglycerate mutase 2, Pkm : pyruvate kinase PKM isoform M1, Pklr : pyruvate kinase PKLR.

Table 10. Select liver transcripts in control versus DM rats related to lipid metabolism

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Fasn	12.54	11.28	-0.15	0.7863
Acaca	5.15	4.25	-0.27	0.6379
Acacb	3.51	3.62	0.04	0.9344
Acsf2	3.63	14.19	1.96	0.0018
Acss3	26.66	8.68	-1.61	0.0091
Acadl	374.51	452.38	0.27	0.6428
Echs1	1.02	1.13	0.13	0.8826
Hsd17b10	480.61	801.72	0.73	0.2107
Acaa2	983.14	1102.44	0.16	0.7879

Fasn : fatty acid synthase, Acaca : acetyl-CoA carboxylase alpha, Acacb : acetyl-CoA carboxylase 2 precursor, Acsf2 : acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial precursor, Acss3 : acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial isoform 2, Acadl : long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor, Echs1 : enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor, Hsd17b10 : 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, Acaa2 : 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial.

Table 11. Select liver transcripts in DM versus DM+CA rats related to lipid metabolism

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Fasn	10.78	12.34	0.19	0.6807
Acaca	4.06	8.19	1.00	0.0483
Acacb	3.46	7.53	1.11	0.0357
Acsf2	13.55	3.68	-1.88	0.001
Acss3	8.30	17.76	1.09	0.0346
Acadl	432.25	311.78	-0.47	0.3039
Echs1	1.07	0.87	-0.30	0.7465
Hsd17b10	766.05	587.70	-0.38	0.3953
Acaa2	1053.38	809.06	-0.38	0.4152

Fasn : fatty acid synthase, Acaca : acetyl-CoA carboxylase alpha, Acacb : acetyl-CoA carboxylase 2 precursor, Acsf2 : acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial precursor, Acss3 : acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial isoform 2, Acadl : long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor, Echs1 : enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor, Hsd17b10 : 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, Acaa2 : 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial.

Table 12. Select soleus muscle transcripts in control versus DM rats related to lipid metabolism

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Pla2g2a	11.17	39.97	1.83	0.0005
Lpl	28.55	62.63	1.13	0.0017
Pld3	14.07	6.92	-1.02	0.0131
Acsf2	4.47	13.61	1.60	0.0001
Acad11	10.81	34.41	1.67	0.0001
Acaa2	225.43	458.38	1.02	0.0075
Hsd17b10	208.84	209.68	0.01	0.9858
Echs1	0.26	0.66	1.30	0.3154

Pla2g2a : phospholipase A2, membrane associated precursor, Lpl : lipoprotein lipase precursor, Pld3 : phospholipase D3, Acsf2 : acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial precursor, Acad11 : acyl-CoA dehydrogenase family member 11, Acaa2 : 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial, Hsd17b10 :3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, Echs1 : enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor.

Table 13. Select soleus muscle transcripts in DM versus DM+CA rats related to lipid metabolism

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Pla2g2a	40.20	19.62	-1.03	0.0017
Lpl	62.99	91.58	0.53	0.066
Pld3	6.96	10.19	0.55	0.0984
Acsf2	13.69	11.95	-0.19	0.5253
Acad11	34.60	22.70	-0.60	0.1405
Acaa2	461.01	439.42	-0.06	0.8249
Hsd17b10	210.88	227.84	0.11	0.703
Echs1	0.66	0.43	-0.62	0.4714

Pla2g2a : phospholipase A2, membrane associated precursor, Lpl : lipoprotein lipase precursor, Pld3 : phospholipase D3, Acsf2 : acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial precursor, Acad11 : acyl-CoA dehydrogenase family member 11, Acaa2 : 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial, Hsd17b10 :3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, Echs1 : enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor.

Table 14. Select visceral fat tissue transcripts in control versus DM rats related to lipid metabolism

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Fasn	63.76	19.61	-1.70	0.0478
Acacb	2.55	10.00	1.96	0.0229
Acaca	9.69	9.80	0.01	0.9816
Slc27a1	70.82	175.26	1.30	0.1483
Slc27a3	46.57	9.52	-2.28	0.0106
Lipe	308.46	409.82	0.40	0.7462
Lpl	2259.30	2072.92	-0.12	0.9400
Pla2g2a	87.33	220.45	1.33	0.0933

Fasn : fatty acid synthase, Acacb : acetyl-CoA carboxylase 2 precursor, Acaca :acetyl-CoA carboxylase alpha, Slc27a1 : long-chain fatty acid transport protein 1, Slc27a3 : long-chain fatty acid transport protein 3 precursor, Lipe : hormone-sensitive lipase, Lpl : lipoprotein lipase precursor, Pla2g2a : phospholipase A2, membrane associated precursor.

Table 15. Select visceral fat tissue transcripts in DM versus DM+CA rats related to lipid metabolism

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Fasn	20.41	32.99	0.69	0.2305
Acacb	10.41	8.63	-0.27	0.6035
Acaca	10.20	17.59	0.78	0.1402
Slc27a1	182.43	172.79	-0.07	0.9068
Slc27a3	9.91	17.63	0.83	0.1455
Lipe	426.60	652.08	0.61	0.647
Lpl	2157.79	2469.62	0.19	0.5583
Pla2g2a	229.47	56.96	-2.01	0.0003

Fasn : fatty acid synthase, Acacb : acetyl-CoA carboxylase 2 precursor, Acaca :acetyl-CoA carboxylase alpha, Slc27a1 : long-chain fatty acid transport protein 1, Slc27a3 : long-chain fatty acid transport protein 3 precursor, Lipe : hormone-sensitive lipase, Lpl : lipoprotein lipase precursor, Pla2g2a : phospholipase A2, membrane associated precursor.

Table 16. Select liver transcripts in control versus DM rats related to insulin signaling

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Insr	6.95	3.11	-1.15	0.0466
Irs1	2.46	1.27	-0.95	0.1653
Irs2	3.30	2.39	-0.46	0.4587
Irs3	0.61	3.75	2.60	0.0180

Insr : insulin receptor preproprotein, Irs1 : insulin receptor substrate 1,
Irs2 :insulin receptor substrate 2, Irs3 : insulin receptor substrate 3.

Table 17. Select liver transcripts in DM versus DM+CA rats related to insulin signaling

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Insr	2.98	6.20	1.05	0.0470
Irs1	1.21	3.31	1.44	0.0184
Irs2	2.28	2.51	0.13	0.8038
Irs3	3.58	0.88	-2.02	0.0117

Insr : insulin receptor preproprotein, Irs1 : insulin receptor substrate 1,
Irs2 :insulin receptor substrate 2, Irs3 : insulin receptor substrate 3.

Table 18. Select soleus muscle transcripts in control versus DM rats related to insulin signaling

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Insr	2.20	4.21	0.89	0.058
Irs1	6.20	3.27	-0.94	0.0473
Irs2	9.79	12.85	0.39	0.2641
Irs3	0.19	0.40	1.07	1

Insr : insulin receptor preproprotein, Irs1 : insulin receptor substrate 1,
 Irs2 :insulin receptor substrate 2, Irs3 : insulin receptor substrate 3.

Table 19. Select soleus muscle transcripts in DM versus DM+CA rats related to insulin signaling

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Insr	4.03	3.63	-0.15	0.6453
Irs1	3.29	7.70	1.15	0.0004
Irs2	12.92	15.95	0.30	0.2977
Irs3	0.41	0.57	0.47	0.5492

Insr : insulin receptor preproprotein, Irs1 : insulin receptor substrate 1,
Irs2 :insulin receptor substrate 2, Irs3 : insulin receptor substrate 3.

Table 20. Select visceral fat tissue transcripts in control versus DM rats related to insulin signaling

Transcripts	RPKM		DM/CT Fold change	p-value
	CT	DM		
Insr	5.61	12.03	1.10	0.1569
Irs1	3.57	4.48	0.32	0.6976
Irs2	11.78	16.36	0.47	0.5201
Irs3	43.42	52.97	0.28	0.6954

Insr : insulin receptor preproprotein, Irs1 : insulin receptor substrate 1,
Irs2 :insulin receptor substrate 2, Irs3 : insulin receptor substrate 3.

Table 21. Select visceral fat tissue transcripts in DM versus DM+CA rats related to insulin signaling

Transcripts	RPKM		DM+CA/DM Fold change	p-value
	DM	DM+CA		
Insr	12.53	13.90	0.14	0.7688
Irs1	4.66	8.49	0.86	0.1096
Irs2	17.03	16.63	-0.03	0.9470
Irs3	55.14	86.76	0.65	0.2258

Insr : insulin receptor preproprotein, Irs1 : insulin receptor substrate 1,
Irs2 :insulin receptor substrate 2, Irs3 : insulin receptor substrate 3.

Fig. 1. Flavonoid structure: 2 phenyl rings (A and B), 1 heterocyclic ring(c)

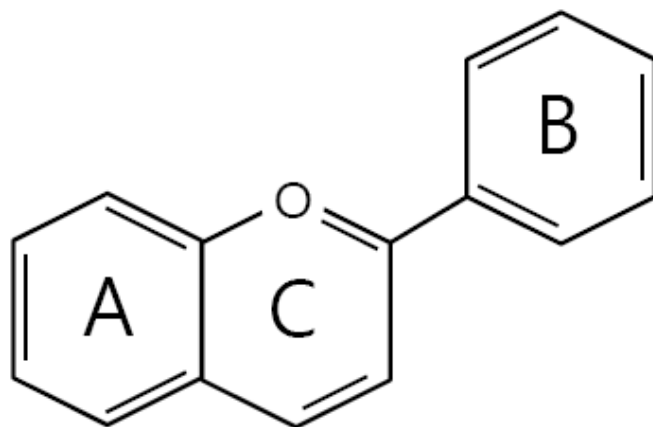
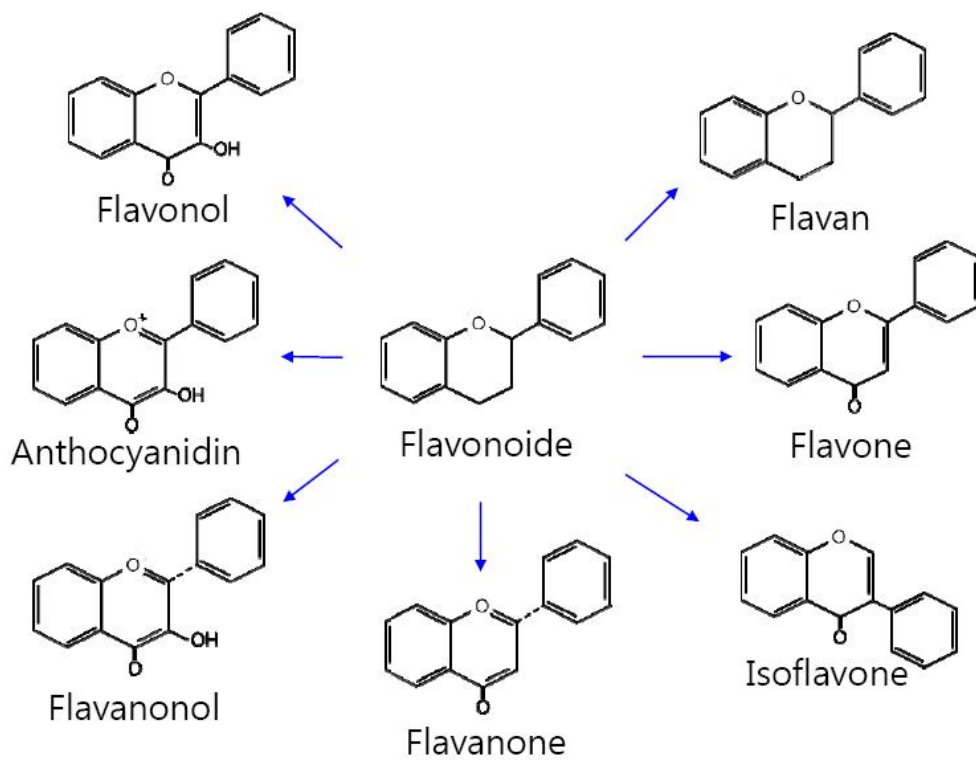


Fig. 2. Chemical structure of flavonoid



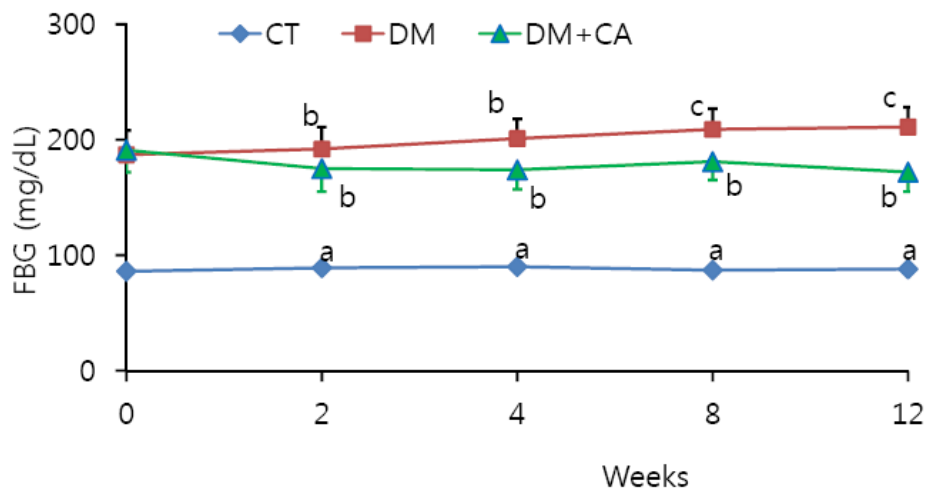


Fig. 3. Effects of catechin on fasting blood glucose(FBG) in diabetic rats. Rats were administered catechin for 12 weeks, the fasting blood glucose were determined after 12 hrs fasting. DM: diabetes mellitus, DM+CA: diabetic rats treated with catechin (0.1% in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a-c) above the bars within the same weeks are significantly different at the level of $p < 0.05$ by Duncan's multiple range.