

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 膵臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 관한 免疫細胞化學的 研究

魯鎮求* · 朴呈培** · 李仙童***

〈 目 次 〉

I. 緒 論
II. 實 驗
III. 結 果

IV 結 論
參考文獻

I. 緒 論

最近들어 糖尿病의 增加는 生活水準向上으로 因한 食生活의 影響등에 起因하는 慢性代謝性 消耗疾患으로 病因과 症狀이 매우 多樣하게 알려진 疾患으로 심각한 病이라 하지 않을 수 없다. 처음에는 별다른 自覺症狀을 느끼지 못하다가 점차 多飲·多食·多尿등을 일으키는 이 病은 洋方的으로는 Insulin의 相對的·絶對的 缺乏으로 因해 過血糖과 糖尿가 일어나는 동시에 複雜한 代謝異常을 隨伴하는 疾患으로 體重減少·ketoacidosis(이상 Type I)과 肥滿·insulin 正常·膵臟內 地域的 atrophy(이상 Type II)등을 일으킨다. 病因은 遺傳因子와 誘發因子가 함께 作用하는 것과 직접 Langerhans islet에서 障碍되는 경우도 있다.¹³⁾ Insulin은 血糖이 상승하면 膵臟의 β細胞에서 分泌되는 것으로 포도당의 말초적 利用을 促進시키고 肝에서의 遊離를 抑制하여 血糖量을 低下시킴으로써 keton 體生成을 抑制하는 것이다.¹⁴⁾

韓醫學에서는 糖尿病을 消渴 或은 消瘵의 範疇에 포함하는바^{6,9)} 消飮·消耗·消瘦·肌消를 意味하고 渴은 內熱로 因하여 津液이 적어지는 것을 말하고¹⁰⁾ 瘵은 慢性病 或은 發熱의 뜻을 內包하고 있다 하였다.⁸⁾ 消渴의 그 原因은 熱·陰虛·燥·火이며^{1,2)} 上消·中消·下消로 分類하여 上消는 渴而多飲하고 中消는 消穀善飢하고 下消는 渴而尿數有膏油⁴⁾라고 하였으나 金⁵⁾ 등은 三消가 區分하기 困難하다 하였다. 治法은 消熱·瀉火·生津止渴·滋陰등의 方法과 對症 및 食餌療法을 併用하고 있다.⁹⁾

現在까지 糖尿病에 對한 여러 學者들의 研究는 Lazarow²²⁾·Bunnag²³⁾ 등의 생쥐의 Alloxan 投與로 因한 糖尿 誘發與否 實驗을 비롯하여 Brosky와 Logothetopoulos²⁴⁾은 생쥐와 기니픽, Ganda²⁵⁾ 등의 膵臟 內分泌機能과 形態學的 變化 與否에 對한 報告에서 Alloxan 投與로 糖尿動物의 膵島數減少, β細胞의 萎縮을 報告하였다. 또한 韓方에서 實驗動物에 對한 消渴應用 藥物의 效果를 立證한 여러 報告가¹⁶⁻²¹⁾ 있었다.

*: 圓光 韓醫院 (전남 영암)

** : 감로국 韓醫院 (전북 전주)

*** : 세명 韓醫院 (서울)

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 脾臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 관한 免疫細胞化學的 研究

이에 著者는 葫蘆科(박과)에 屬한 多年生 蔓草인 하늘타리 뿌리의 코르크 부분을 벗긴것으로 淸熱生津·淸肺化痰·消腫排膿^{11,12,15)}의 效能을 지닌 天花粉을 「消渴須用 天花粉爲主」⁹⁾에 근거하여 Alloxan 投與 Rat의 脾島에 어떠한 影響을 주는지 實驗한 결과 有意性이 있어 이에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 實驗動物 및 材料

1) 動 物

本 대학 實驗動物室에서 飼育한 200 g 內외의 Sprague Dawley系 白鼠를 암수구별 없이 使用하여 사료와 물을 충분히 供給하면서 實驗開始 5日間 實驗室 環境에 適應시킨후 이를 대조군과 실험군으로 나누어 각 群에 30마리씩 배정하였고 기간 별로 5마리씩 희생하였다.

2) 材 料

試驗 藥材는 市中에서 購入하여 本 大學 本草學敎室에서 嚴選한 天花粉(Trichosanthes kirilowi)을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 韓藥 抽出方法

天花粉 400 g을 Round flask에 물 3000cc와 混合하여 3시간 煎탕한후 濾過하여 濾過된 溶液을 증발기에서 加溫濃縮하여 800 ml 濃縮液을 얻었다.

2) Alloxan 投與方法

Alloxan 群 및 韓藥投與群은 Alloxan monohydrate(Sigma 제품)을 증류수에 5% 되도록 溶解한후 白鼠 體重 100 mg/kg씩 尾精脈에 一回 注射하였다.

3) 韓藥 投與方法

韓藥 投與群은 Alloxan 投與後 天花粉 濃縮液을 매일 體重 1 ml/150 g씩 一畵 胃管을 이용하여 經口投與하였으며, 대조군 에는 生理的食鹽水를 1 ml/150 g씩 經口投 與하였다.

3. 血糖 測定方法

Alloxan 糖尿를 야기한후 1일, 1,2 및 4. 주에 각각 심장으로 부터 채혈하여 REFLO-LUXIIM 血糖측정기(녹십자)와 혈당 kit (Haemoglucotest, 녹십자)를 利用하여 血糖 의 濃度를 측정하였다.

4. 組織切片 製作方法

1일, 1,2 및 4주에 體重의 變化를 조 사한후 實驗動物은 頸椎脫骨후 開腹하여 脾門에 접해있는 脾臟의 尾部를 切取하여 Bouin 溶液에 일정시간 固定하고 5 μm 두께의 Paraffin 연속切片을 만들었다.

5. 染色方法

一般染色으로는 Hematoxylin-Eosin 二重 染色과 脾島內의 內分泌 細胞중 insulin 分泌 細胞를 染色하기 위하여 Gomori's Aldehyde fuchsin method에 의한 特殊染色을 하였으며 免疫細胞化學的 染色方法으로 PAP 방법 (Sternberger, 1979)을 시행하였다. 免疫細胞化學的 染色方法은 먼저 脾臟組織에 內 在되어 있을 Peroxidase를 제거하기 위해 0.5% periodio acid에 3분간 반응시킨후 非蛋白質에 의한 非特異性 反應을 억제하기 위하여 normal goat serum(Sigma 제품)에 30분간 적용시켰다. 1차 抗血清으로는 guinea pig anti-human insulin(DAKO, U.S.A)으 로서 4℃에서 12-24시간 反應시킨 다음

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 胰臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 관한 免疫細胞化學的 研究

2차 抗血清으로서 horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-guineapig IgG(Sigma 제품)에 30분간 반응시킨후 tris buffer(TB, 0.05M, pH 7.3)에 發色製인 3.3-diaminobenzidine-4HCl(DAB, Sigma 제품) 및 H₂O₂가 각각 0.055% 및 0.0035%가 混合된 용액에서 진한 갈색으로 正色반응시켰다. 正色 반응을 마친 절편은 Mayer hematoxylin으로 分別 染色을 하였다.

6. 觀察方法

膵島의 一般의인 組織學的 所見과 膵島內 insulin 分泌細胞가 染色된 膵島의 숫적 變動을 觀察하기 위하여 胰臟의 橫斷組織표本을 白鼠 1마리당 5개를 임의로 選定하여 나타난 膵島의 數를 總數로 定하고 各 實驗群마다 5마리의 平均數를 百分率로 換算하여 比較 觀察하였으며, 免疫組織化學的 方法에 의하여 染色된 組織표本은 廣

학편미경하에서 組織切片에 出現하는 膵島를 100개 이상 선택하여 선택된 膵島內에 出現하는 insulin분비세포를 계수하여 그 出現수를 백분율로 換算하여 比較 觀察하였다.

III. 結 果

1. 體重의 變化

Alloxan糖尿 야기후 1일, 1,2 및 4주제 對照群과 天花粉 投與群의 體重의 變化를 조사하였다(그림 1).

對照群에서는 1일제만 약간 감소하였고 1,2 및 4주동안 계속 體重이 감소하였다. 天花粉 投與群에서도 1주까지는 對照群과 비슷하게 감소하였으나 2주, 4주제에는 對照群에 비해 23~28%의 현저한 증가를 보였다.

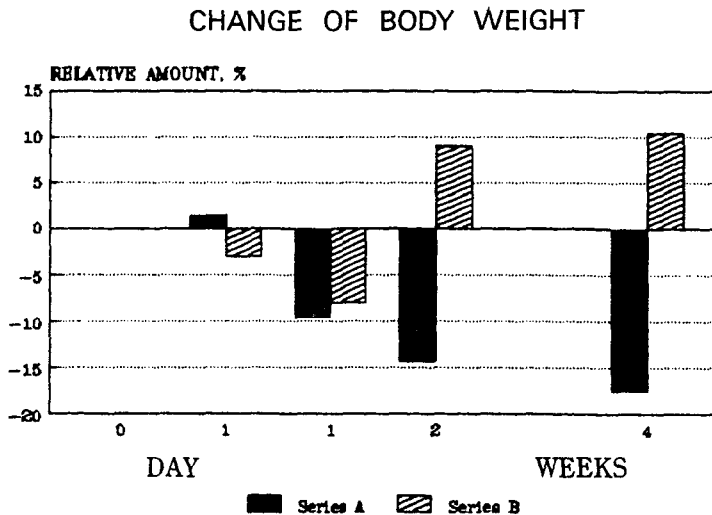


Fig. 1. Change of body weight after Trichosanthes kirilowi extract administration during four weeks in Alloxan-induced diabetic rats.

Series A : Control, Series B : Extract

2. 血糖의 변화

Alloxan糖尿 야기후 1일, 12 및 4주째 對照群과 天花粉 投與群의 혈1糖의 변화를 조사하였다(그림 2).

정상 對照群이 血糖濃度는 83~109 mg/dl였으며, Alloxan 對照群에서는 1일군부터 279~310 mg/dl로 증가하기 시작하여 投與後 1주군에서는 334 mg/dl로, 4주군에서는

265 mg/dl의 過血糖 증상을 보였다. 한편 天花粉 投與群에서는 1일, 1주군에서는 303~353 mg/dl로 증가하였으나 2주군에는 123 mg/dl, 4주군에는 126 mg/dl로 Alloxan 對照群에 비해 현저히 감소하였으나 정상 대조군의 血糖值보다는 미약하게 증가하였다.

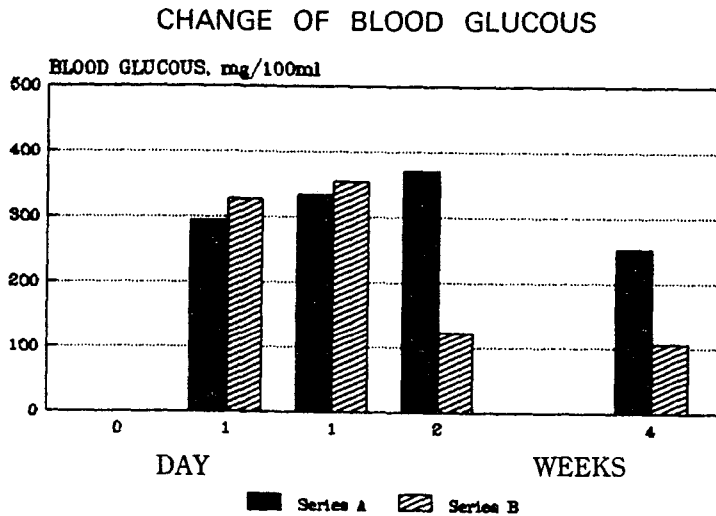


Fig. 2. Change of blood glucous level after Trichosanthes kirilowi extract administration during four weeks in Alloxan-induced diabetic rats.

Series A : Control, Series B : Extract

3. Hematoxylin-eosin 二重染色 관찰

정상 대조군 白鼠의 H-E 二重染色표본에서 관찰된 胰島는 胰臟 實質내에 胰島를 형성하여 散在性으로 분포하고 있었고 그 모양은 대체로 球型을 띠고 있었으며 結合組織에 의해 둘러 싸여 있었다. H-E 이중염색표본에서는 內分泌細胞는 구분할 수 없었으며 이들 細胞들은 不規則한 띠를 형성하고 있었고 이들 사이에 毛細血管이

잘 발달되어 網狀을 이루고 있었다(사진 a).

Alloxan 대조군의 1일군과 1주군의 胰島주위에 淋巴球 및 單核球들의 침윤현상을 관찰할 수 있었으며, 일부 내분비 세포의 脫顆粒 및 核壞死도 관찰되었다(사진 b). 2주군과 4주군에서는 침윤된 淋巴球 수는 오히려 감소하였으나 胰島의 심한 萎縮현상이 관찰되었다. 天花粉 投與群에서는 1일군과 1주군에서 Alloxan 대조군과 유사

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 胰臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 關한 免疫細胞化學的 研究

하였으나 2 주군과 4 주군에서는 胰島의 萎縮현상은 미약하게 관찰되었다.

4. Gomori's Aldehyde fuchsin에 染色된 胰島의 숫적변화

정상 대조군 白鼠의 Aldehyde fuchsin에 染色된 인슐린 分泌細胞는 胰島內에 散在性으로 高루 분포하였고 胰島의 60~70 %를 차지하였다. 인슐린 細胞가 염색된 胰島는 40 ± 2.3 으로 나타났으며 Aldehyde fuchsin에 대한 染色性은 상당히 良好하였다 (사진 c).

Alloxan 대조군의 경우 정상대조군에 비해 1 일군 72 %, 1 주군 80 %, 2 주군 66 % 및 4 주군 88 %로 현저히 감소하였으며 4 주 동안 Aldehyde fuchsin에 대한 染色性은 아주 미약하였으며 核壞死 및 脫顆粒 현상이 심하게 관찰되었다. 天花粉 投與群의 1 일, 1 주 및 2 주군은 각각 57 %, 50 %, 55 %로 감소하였고 Aldehyde fuchsin에 대한 染色性은 Alloxan 대조군과 類似하였으나, 4 주군은 44 % 감소하였고 Aldehyde fuchsin에 대한 染色性도 Alloxan 대조군과 유사하게 관찰되었으나 脫顆粒 및 核壞死 현상은 관찰할 수 없었다(그림 3).

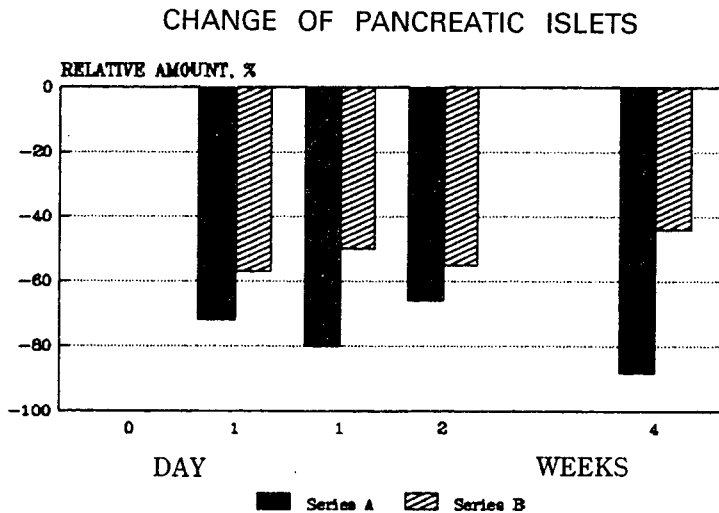


Fig. 3. Change of pancreatic islets stained with Aldehyde fuchsin Trichosanthes kirilowi extract administration during four weeks in Alloxan-induced diabetic rats. Series A : Control, Series B : Extract

5. 免疫細胞化學的 染色 관찰

정상 대조군 白鼠의 胰島에 出現하는 인슐린 分泌細胞는 胰島內에 散在性으로 高루 분포하고 있었다(사진 d). Alloxan 대조군은 정상 대조군에 비해 인슐린 분

泌細胞 出現率이 각각 82 %, 93 %, 93 % 및 96 %로 감소하였고, 인슐린 分泌細胞의 細胞質에 뚜렷한 脫顆粒과 核壞死 현상이 심하게 관찰되었다. 天花粉 投與群에서는 정상 대조군에 비해 出現率이 각각 83 %,

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 胰臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 관한 免疫細胞化學的 研究

89%, 53% 및 47%로 감소하였고, 특히 xan 대조군에 비해 미약하였다(그림 4 4주군에서는 脫顆粒과 核壞死 현상은 Allo- 사진 e~h).

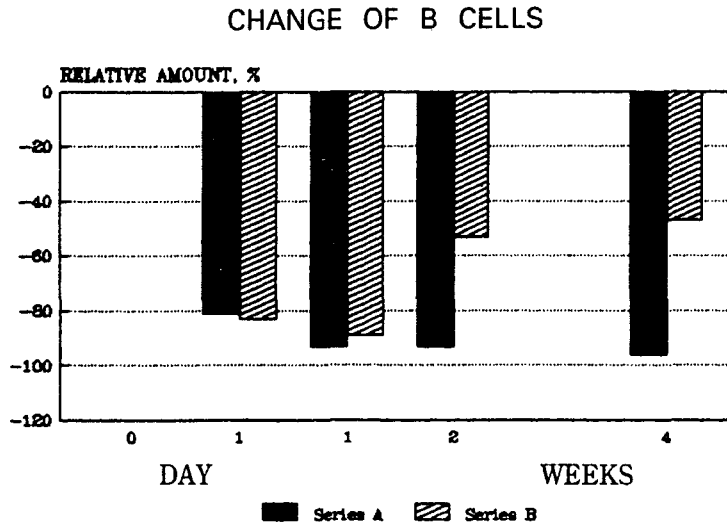


Fig. 4. Change of insulin-immunoreactive cells(B-cells) in pancreatic islets after Trichosantheskirilowi extract administration during four weeks in Alloxan induced diabetic rats.

Series A : Control, Series B : Extract

IV. 結 論

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 Alloxan 糖尿 Rat의 胰島에 미치는 影響을 觀察하기 爲하여 體重 200g 內外의 Sprague Dawley系 白鼠를 利用하여 正常群·Alloxan群 天花粉群으로 나누어 Alloxan群 및 天花粉群에 5% Alloxan monohydrate를 100 mg/kg을 尾精脈에 1回 注射하였으며 天花粉群은 天花粉 濃縮液을 매일 體重 1ml/150g씩 1回 胃管을 利用하여 經口投與하여 體重·血糖을 측정 비교하였으며 一般染色·特殊染色·免疫細胞化學的 染色方法을 擇하여 一般的인 組織學的 所見과 胰島內 β細胞가 染色된 胰島의 數를 光學顯微鏡

下에서 觀察하였던바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 天花粉群에서의 體重의 變化는 Alloxan群이 계속적인 減少를 보인 반면 天花粉群은 2주 4주째에는 23~28%의 현저한 增加를 보였다.

2. 天花粉群에서의 血糖의 變化는 天花粉群이 1주를 고비로 Alloxan群에 비해서 현저히 감소하였으나 正常群보다는 미약하게 증가하였다.

3. 天花粉群의 H-E 一般染色에서의 組織學的 所見은 대체적으로 Alloxan群과 유사하였으나 胰島의 萎縮현상에서 2주群과 4주群에서 Alloxan群에 비해서 미약하게 관찰되었다.

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 脾臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 관한 免疫細胞化學的 研究

4. 天花粉群의 Gomori 特殊染色에서 Aldehyde fuchsin에 대한 染色性은 Alloxan 群과 類似하였으나 4 주群에서 脫顆粒 및 核壞死 現象은 관찰할 수 없었다.

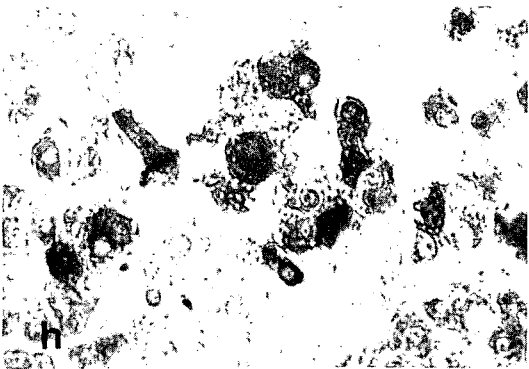
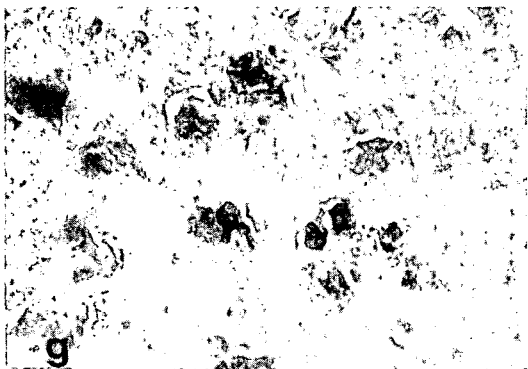
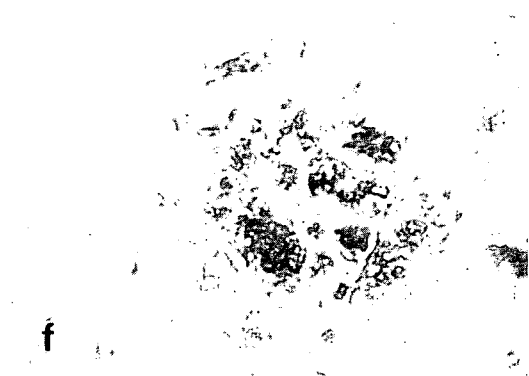
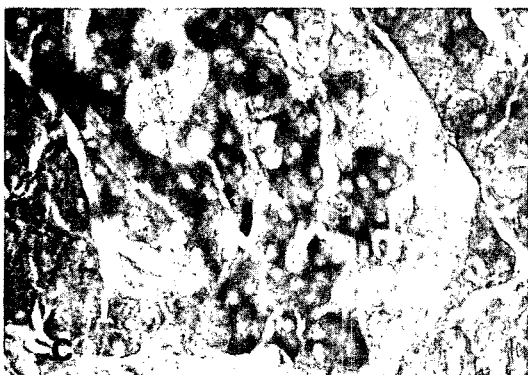
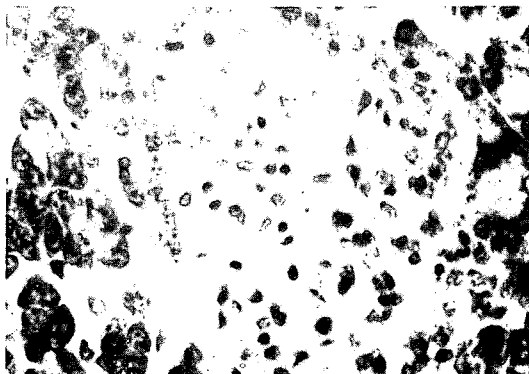
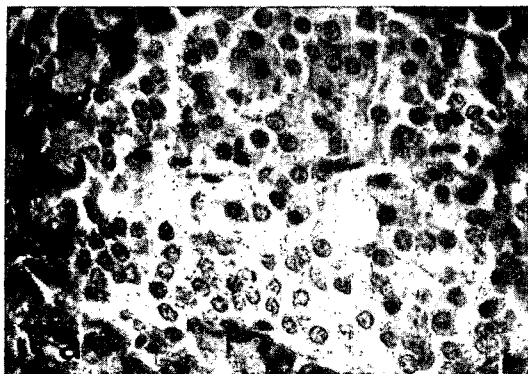
5. 天花粉群의 免疫細胞化學的인 染色에서 Alloxan群에 비하여 4 주群에서 脫顆粒 및 核壞死現象이 미약하였다.

參 考 文 獻

1. 朱震享：丹溪心法，五州出版社，中國，下卷，pp. 499~504, 1975.
2. 李 果：東垣十書，鴻文書局，上海，上卷，p. 12, 13, 1975.
3. 龔 廷賢：萬病回春，人民衛生出版社.
4. 許 浚：東醫寶鑑，서울，南山堂，p. 506, 507, 1966.
5. 金定濟，金賢濟：東醫臨床要監，서울，書苑堂，p. 134, 1977.
6. 李昌彬：糖尿病의 韓醫學的 治療方法，東洋醫學 3：1 號，pp. 41~42, 1977.
7. 高本釗(1981)：新編中藥大辭典，新文豐出版公社.
8. 池芝盛：糖尿病學，人民衛生出版社，北京，p. 145, 1982.
9. 上海中醫學院編：中醫內科學，香港，商務印書館，pp. 503~511, 1977.
10. 金賢濟，洪元植譯：漢醫學辭典，成補社，p. 499, 1983.
11. 辛民教：原色 臨床本草學，永林出版社，pp. 250~252, 241~242, 283~284.
12. 李尚仁 外 2人(1982)：韓藥 臨床應用，成補社.
13. 慶北醫大 病理學教室：最新病理學 高文社，p. 86, 1987.
14. 韓國藥學大學協議會：藥物學，文聖社，pp. 662~667, 1990. 4 卷
15. 朱榮丞：東醫寶鑑에 收錄된 韓藥物에 對한 研究，大韓韓醫學會誌 第 11 卷，第 2 號
16. 李京燮：竹瀝湯，加味竹瀝湯이 血壓 및 血堂에 미치는 影響，慶熙大學校 大學院 博士學位論文，1977.
17. 李學仁：桑白皮抽出物投與가 家兔의 實驗的 消渴에 미치는 影響，東洋醫學 3：3 號，pp. 43~45, 1977.
18. 金元熙：消渴에 應用되는 白虎湯이 Alloxan 糖尿에 미치는 影響，慶熙韓大論文集，5：1~21, 1978.
19. 李彥政：玉女煎이 家兔의 Alloxan 糖尿에 미치는 影響，圓光大學校 大學院 碩士學位論文，1982.
20. 姜庭鎬：活血潤燥生津飲이 Alloxan 投與 白鼠에 미치는 影響，圓光大學校 大學院 學位論文集 第 5 輯，pp. 255~277, 1982.
21. 徐容培：加味地黃湯이 Alloxan 糖尿 白鼠의 脾臟島에 미치는 影響，圓光大學校 大學院 碩士學位論文集 第 6 輯，pp. 246~258, 1984.
22. Lazarow, A : Alloxan diabetes in the mouse. J. Lab. Clin. Med, 32 : 1258~1261, 1947.
23. Bunnag, S.C., Warner N.E., Bunnag, S : Effect of Alloxan on the mouse pancreas during and after recovery from diabetes. Diabetes, 16 : 83~84, 1967.
24. Brosky, G. Logothetopoulos J : Streptozotocin diabetes, 18 : 606~611, 1969.
25. Ganda, O.P. Rossini, A.A : Studies on streptozotocin diabetes. Diabetes 25 : 595~603, 1983.

天花粉(Trichosanthes kirilowi)이 實驗的 糖尿 흰쥐의 脾臟 內分泌細胞에 미치는 影響에 관한 免疫細胞化學的 研究

寫 眞 附 圖



Legends for Figures

- Fig. a. A pancreatic islet of the normal rat stained with hematoxylineosin. There are numerous endocrine cells which comprise the irregularly arranged cord type. x400.
- Fig. b. A pancreatic islet of the Alloxan diabetic rat stained with hematoxylin-eosin at one day after Alloxan treatment. Note the necrosis of pancreatic islet. x400.
- Fig. c. A pancreatic islet of the normal rat stained with Gomori's Aldehyde fuchsin method. Note that numerous B-cells are distributed throughout the islet of pancreas. x400.
- Fig. d. Antiinsulin-PAP stain. Note that numerous B-cells are distributed throughout the islet of normal rat. x400.
- Fig. e. Antiinsulin-PAP stain. B-cells are remarkably decreased in number and weakly stained the same as the Alloxan diabetic rat at one day after Trichosanthes kirilowi extract administration. x400.
- Fig. f. Antiinsulin-PAP stain. B-cells are degranulated and weakly stained the same as the Alloxan diabetic rat at one week after Trichosanthes kirilowi extract administration. x400.
- Fig. g. Antiinsulin-PAP stain. Deeply stained B-cells are more increased than those of Alloxan diabetic rat at two weeks after Trichosanthes kirilowi administration. x400.
- Fig. h. Antiinsulin-PAP stain. Deeply stained B-cells are more increased than those of Alloxan diabetic rat at four weeks after Trichosanthes kirilowi extract administration. x400.