

大黃甘草飲子와 그 構成藥物群이 Alloxan 유도 糖尿 白鼠의 혈청 조성 및 항산화 효과에 미치는 영향

고원도, 곽동걸, 신화석, 최외철, 박선동
동국대학교 한의과대학 방제학교실

Abstract

Effects of Daehwanggamchoeumja and its component groups on diabetes, free radical and antioxidative defense system in Alloxan-induced diabetic rats

Go won do, Gwak dong gul, Shin hwa seog, Choi oi chul, Park sun dong
Department of Oriental Medical Prescription Dongguk University

The purpose of this study was to reseach the effect of Daehwanggamchoeumja(大黃甘草飲子) and its component groups on diabetes, free radicals, and antioxidants system in Alloxan-induced diabetic rats. The experimental group was divided into three groups: Daehwanggamchoeumja(DG), and its components groups, Gamdutang (Gamcho&Daedu; DG-1) and Daehwanggamchotang(DG-2).

The results were obtained as follows:

1. In the study of effect on diabetic metabolic dysfunction(Glucose, Triglyceride, Total Cholesterol, HDL Cholesterol, Total Protein, Albumin, Creatine, BUN), only DG has a significant effect.
2. In the study on free radical scavenging effect in *vitro*(the suppressing effect on peroxidation of linoleic acid on concentration, the scavenging effect of DPPH

교신저자: 박 선 동

경북 경주시 석장동 770번지 경북대학교 한의과대학 방제학교실

TEL : 054)770-2371

E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

접수일자 : 2002. 11. 18

수정일자 : 2002. 12. 14

채택일자 : 2002. 12. 21

radical, inhibitory effect of superoxide in xanthine-xanthine oxidase system, inhibitory effect on lipid peroxidation reaction by hydroxy radical in $H_2O_2-Fe^{2+}$ system, and the effect on Nitrate reductase activity), DG and DG-2 have more effect than DG-1 relatively.

3. In the study on antioxidants system *in vivo*(The level of serum LPO, The level of hepatic LPO, Catalase, GSH, GST), only DG has a significant effect.

These results suggest that Daehwanggamchoeumja(大黃甘草飮子) has an effect on diabetes, peroxidative damage by free radical, so it seems to be useful to prevent and treat diabetes. The mechanisms of these are supposed to be involved in antioxidant and three drugs' cooperative synergy effect.

Key Words : Daehwanggamchoeumja, diabetes, antioxidant, alloxan

I. 緒 論

大黃甘草飮子は 甘豆湯과 大黃甘草湯이 결합된 약물구성을 하고 있으며, 消渴에 대한 이론과 처방들을 서술하고 있는 金代 劉完素의 「黃帝素問宣明論方·燥門」¹⁾에 처음으로 기재되어 있다. 「東醫寶鑑·消渴門」²⁾에서도 消渴통치약으로 소개되고 있는데, 大黃, 甘草, 大豆의 3가지 약물로 구성되어 있다. 大豆는 滋腎水하고, 大黃은 瀉胃火하며, 甘草는 清熱解毒·生津止渴하는데, 이는 劉完素의 “養陰退陽”, “滋水瀉火”의 이론이 반영된 방제이다³⁾.

消渴이란 消穀善飢하면서 渴而多飮하는 병증으로 증상에 따라 上消, 中消, 下消의 三消로 구분하고 있으며, 이는 당뇨병의 발현증상과의 유사성 때문에 한의학에서는 당뇨병을 消渴에 범주에 배속시켜 치료에 접근하고 있다.⁴⁾

당뇨병은 고혈당 상태를 나타내는 여러 질환을 말하는 것으로 인슐린 분비의 절대적 또는 상대적 부족이나 인슐린 표적세포

에서의 인슐린의 생물학적 효과감소로 인해 발생하는 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애로 특징지어지는 질병이다.

이러한 대사장애 상태가 지속되면 급성 또는 만성 합병증이 발생하게 된다.⁵⁾ 당뇨병의 분류는 크게 원발성과 속발성으로 나눌 수 있으며, 원발성 당뇨병은 인슐린 의존형 당뇨병(제1형, IDDM)과 인슐린 비의존형 당뇨병(제2형, NIDDM)으로 나눈다. 제1형 당뇨병(IDDM)은 췌장 β 세포의 심한 감소로 인슐린 분비가 거의 없어 인슐린을 투여받아야 되므로 인슐린 의존성이고, 인슐린 투여가 중단되면 급성 케톤산증과 혼수가 오는데, 유전적 요인, 자가면역반응 및 환경적 인자 등이 상호 연관되어 발생한다.⁶⁾

인슐린 의존형 당뇨를 유발시킬 수 있는 많은 인자 중에서 활성산소가 췌장 β 세포 파괴에 중심역할을 하는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ 활성산소를 발생시키고 췌장 β 세포를 선택적으로 파괴하여 당뇨를 유발하는 alloxan으로 유도된 糖尿白鼠는 인슐린

의존형 당뇨병(제1형, IDDM)의 실험적 모델이 된다.⁸⁾

활성산소종(reactive oxygen species)은 산소라디칼(oxygen free radicals) 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물들을 통칭하는 것으로 superoxide radical($\cdot O_2$), hydroxyl radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 등이 있는데, 활성산소는 반응성이 높기 때문에 주변의 어떤 물질들과도 쉽게 반응하는데, 주로 지질의 산화, DNA의 산화적 손상, 단백질의 산화적 손상을 일으킨다.

이러한 활성산소의 반응성에 대응하여 인체에는 정교한 항산화 방어체계가 발달되어 있는데, SOD, catalase, GSHpx 등이 있다.⁹⁾¹⁰⁾ 이러한 생체방어기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스가 야기되고, 이로 인해 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병, 동맥경화, 피부질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 당뇨병과 당뇨병 합병증도 활성산소와 관련이 깊은 질병이라는 것이 밝혀지고 있어 항산화제를 통한 당뇨병 치료가 연구되고 있다.¹²⁾

한편 대황감초음자 구성약물들인 대황, 감초, 대두의 당뇨와 항산화에 미치는 영향에 관한 실험보고들¹³⁾⁻¹⁵⁾은 있었으나, 대황甘草飲子에 대한 실험 연구는 아직 보고된 바가 없었다. 이에 저자는 대황甘草飲子를 선택하여 실험군을 대황甘草飲子, 甘草湯, 大黃甘草湯의 3군으로 구분한 후, 백

서에 alloxan을 주사하여 고혈당을 유발한 다음, 당뇨병과 관련된 혈당, 혈청 지질 및 자유기 소거, 항산화 방어계에 미치는 영향을 실험관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 약 재

본 실험에 사용한 약재는 東國大學校 附屬韓方病院에서 구입하였고, 실험에 사용한 大黃甘草飲子는 「黃帝素問宣明論方·燥門」¹⁾에 수록된 것으로 약물내용과 1 貼에 해당하는 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition and contents of Daehwanggamchoumja

韓藥名	Drug name	Amount
大黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	2.25 g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6.00 g
大豆	<i>Glycine max Merrill</i>	125.00 g
Total Amount		133.25 g

또한 實驗群에 사용된 大黃甘草飲子 및 그 構成藥物群의 組成과 分量은 다음과 같다.

Table 2. Composition and contents of Experimental Groups

實驗群의 藥物 構成		
實驗群	藥物 및 藥量	總量(g)
大黃甘草飲子(DG)	大黃 6.75g 甘草 18.0g 大豆 375.0g	399.75g
甘草湯(DG-1)	甘草 18.0g 大豆 375.0g	393.0g
大黃甘草湯(DG-2)	大黃 112.5g 甘草 300g	412.5g

2) 동 물

실험동물은 체중 200g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 rat로 7일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 20°C 내외, 습도는 55~60%로 유지하고 light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, rat용 고품 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

3) 시 약

본 실험에 사용한 시약은 alloxan, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), bovine serum albumine, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sodium dodecyl sulfate(SDS), thiobarbituric acid(TBA), sulfosalicylic acid, potassium phosphate, malondialdehyde tetrabutyl-ammonium salt, linoleic acid, xanthine, xanthine oxidase, butylated hydroxy-toluene(BHT), tocopherol, sulfanilic acid, N-(1-Naphthyl)-ethyl-enediamine 등은 SIGMA사에서 구입하였으며, hydrogen peroxide 및 ethanol, methanol, acetic acid와 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다. glucose, triglyceride, high density lipoprotein(HDL), total cholesterol, albumin, total protein, creatinine, blood urea nitrate(BUN) 측정용 kit는 아산제약에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC SHIMADZU Co.)를 사용하였고, 그외 실험에 사용한 모든 시약들은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다.

2. 方 法

1) 검액 조제 및 동물 처치

(1) 검액의 조제

大黃甘草飲子 및 그 構成藥物群을 총량 약 400g에 맞추어 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48 시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하였다. 각 실험군의 약물을 추출한 결과 大黃甘草飲子 59.25 g (14.82%), 甘豆湯 52.34 g (13.37%), 大黃甘草湯 69.18 g (16.77%)을 얻었다.

(2) 동물의 처치

실험 동물은 각 군당 8마리씩 5개의 군으로 나누었고, 모든 실험동물은 실험전 7일간 rat용 고품사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

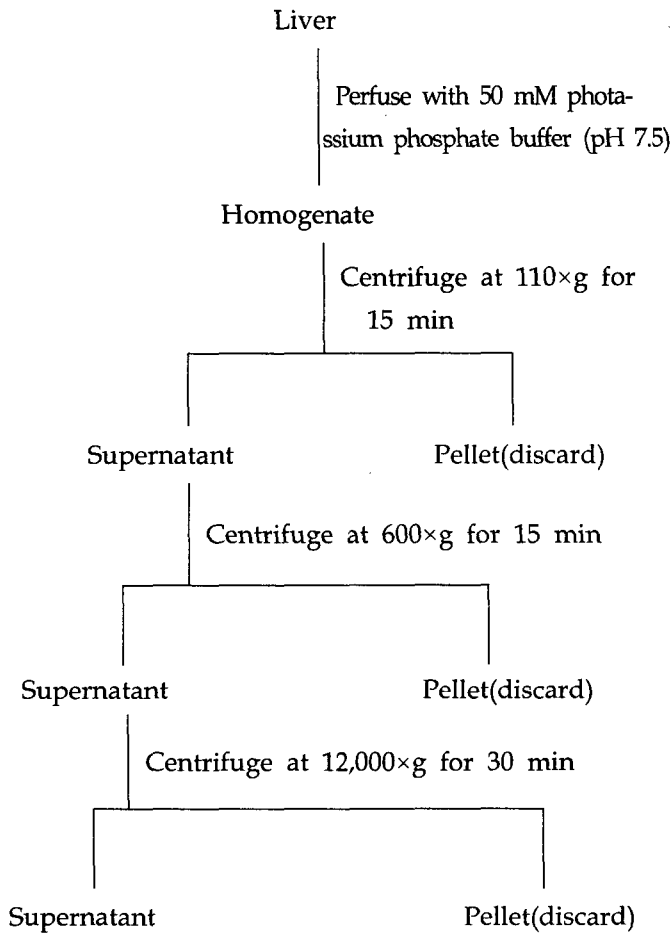
대조군은 alloxan 100 mg/kg을 1회 복강 주사한 후 고품사료와 물을 5일간 제한 없이 공급하였으며, 실험군은 실험군은 大黃甘草飲子(DG group), 甘豆湯 (DG-1 group), 大黃甘草湯(DG-2 group)으로 나눈 후 모두 alloxan 100 mg/kg을 1회 복강 주사하고, rat용 고품사료와 각 추출물들을 500 mg/kg의 농도로 5일간 경구투여하였다. 모든 실험 동물은 생체시료 채취 전 12시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

(3) 생체 시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 심장에서 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 측정 효소원으로 사용하였다. 간장은 조직이 손상되지 않도록 천천히 간문맥에 생리 식염수

를 관류시켜 혈액을 충분히 제거한 후, 간장을 채취하여 생리 식염수로 잘 씻어내어 Whatman 여과지로 식염수를 제거한 후 -70°C 에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 간장 조직의 일부에 4배 용량의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 $110\times g$ 에서 15분간 원심분리하여 일부 상층액은 과산화지질 및 glutathione

함량을 측정하기 위한 시료로 사용하였고, 나머지 상층액은 $600\times g$ 에서 다시 15분간 원심분리하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 취하였으며, 이를 다시 $12,000\times g$ 에서 30분 동안 원심분리하여 미토콘드리아를 제거한 상층액을 취하여 catalase, glutathione-s-transferase 활성도 측정을 위한 시료로 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 에서 실시하였다(Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of hepatic mitochondrial fractions for enzyme studies

2) *in vivo*에서 당뇨 관련 혈청 조성 변화 측정

(1) 혈청중 glucose 함량

혈청중 glucose 함량은 효소법¹⁶⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37 °C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. glucose 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

(2) 혈청중 triglyceride 함량

혈청중 triglyceride 함량은 효소법¹⁷⁾¹⁸⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 10분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, triglyceride 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

(3) 혈청중 total cholesterol 함량

혈청중 total cholesterol 함량은 효소법¹⁹⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고 total cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

(4) 혈청중 HDL cholesterol 함량

혈청중 HDL cholesterol 함량은 효소법¹⁹⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 분리 시액 0.02 ml를 넣고 잘 섞어준 후 실온에서 10분간 방치하고 3000

rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, HDL cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

(5) 혈청중 total protein 함량

혈청중 total protein 함량은 Biuret법²⁰⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.05 ml에 정색시액 5.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 실온에서 30분간 방치하여 파장 540 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, total protein 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 혈청 dl당 g으로 나타내었다.

(6) 혈청중 albumin 함량

혈청중 albumin 함량은 B.C.G법²¹⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 정색시액 5.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 실온에서 10분간 방치하여 파장 630 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, albumin 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 혈청 dl당 g으로 나타내었다.

(7) 혈청중 creatinine 함량

혈청중 creatinine 함량은 Jaffe법²²⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.5 ml에 정색시액 4.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 실온에서 20분간 방치하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 3.0 ml에 0.4N NaOH 1 ml를 넣고 20분간 실온에 방치한 후 파장 520 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, creatinine 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

(8) 혈청중 BUN 함량

혈청중 BUN 함량은 Urease-indophenol 법²³⁾²⁴⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소시액 2.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37 °C에서 5분간 방치하고 정색 시액 2.0 ml를 넣어 다시 37 °C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, BUN 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

3) *in vitro*에서 항산화 효과 측정

(1) 지질자동산화계에서의 항산화능

Linoleic acid 유지 혼탁액은 Osawa 등의 방법²⁵⁾에 따라 제조하였다. linoleic acid 0.13 ml, 99.0% ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 ml를 혼합하고, 각 약재 추출물을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume이 25 ml가 되도록 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고, 40 °C 배양기에서 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

TBA법에 의한 MDA 정량은 Ohkawa 등의 방법²⁶⁾에 따라 실시하였다. 즉 40 °C에서 배양시킨 linoleic acid 혼탁액 50 μ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 ml, 20% acetic acid(pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5 ml를 넣고, 증류수로 이 혼합액의 total volume을 4 ml로 조절한 다음, 5 °C에서 60분간 방치하고, 다시 95 °C에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시켜 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 과산화지질의 함량은 MDA로 표준 검량곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를

MDA μ M로 표기하였다.

(2) DPPH radical 소거능

약재 추출물의 free radical에 대한 소거 효과를 알아보기 위해 Hatano 등의 방법²⁷⁾에 따라 DPPH radical 소거효과를 측정하였다. 각 추출물을 증류수에 농도별로 녹인 후 이 혼합물 4 ml와 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1 ml를 혼합하여 잘 흔들어 주고 실온에서 30분 동안 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Xanthine-xanthine oxidase계에서 superoxide의 생성 억제능

Xanthine-xanthine oxidase계에서 생성되는 superoxide에 대한 각 추출물의 억제 효과를 측정하기 위하여 다음과 같은 반응 용액을 조제하였다. 먼저 250 μ M xanthine 0.5 ml와 농도별 추출액 0.1 ml 및 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1.3 ml를 함유하는 반응용액을 실온에서 3분간 정지한 다음, 0.1unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응용액의 총량을 2 ml로 조절한 후, 290 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

(4) H₂O₂-Fe²⁺계에서 지질과산화 반응 억제능

최종농도가 7.5 mg/ml 인 흰쥐의 간조직 균질액, 1 mM FeCl₂, 3 mM H₂O₂를 함유하는 fenton 반응계에서 H₂O₂-Fe²⁺계의 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응에 대한 억제능을 살펴보기 위해 농도별 약물 추출물이 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)의 반응용액을 1 ml로 하여 37 °C에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

(5) Nitrate reductase 활성 측정

Nitrate reductase 활성 측정은 Gray등²⁸⁾의 방법에 준해 1 mM NaNO₂ 용액 1ml에 일정농도의 농도별 약물 추출액 0.4 ml 첨가하고 1 N HCl을 사용하여 반응 용액의 pH를 1.2로 조정하여 다음 total volume이 10 ml가 되도록 조절하여 37 °C incubator에서 1시간 반응시킨 다음 각 반응액을 1 ml씩 취해 2% acetic acid 용액과 griess 시약 0.4 ml을 배합하여 실온에서 15분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

4) *in vivo*에서 항산화 효과 측정

(1) 혈청중 lipid peroxide 함량

TBA측정은 Suematsu등의 방법²⁹⁾에 따라 clean test tube에 혈청 200 μ l를 넣고, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) solution 225 μ l, 20% acetic acid 1.5 ml, 증류수 75 μ l, 1.2% thiobarbituric acid solution 1 ml를 넣고 잘 섞어준 후 30분간 water bath에서 끓였다. 이후 실온에서 30분간 cooling하고 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 532 nm에서 측정하였다.

(2) 간에서의 lipid peroxide 함량

조직내 LPO함량 측정은 Ohkawa등의 방법²⁶⁾에 따랐다. 조직 마쇄 균질액을 1,000×g에서 원심분리한 후 상층액을 취해 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol : pyridine (15:1)

혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 생성된 시료의 malondialdehyde(MDA) 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였으며 MDA함량은 조직 mg당 nmole로 나타내었다.

(3) 간에서의 catalase 활성

조직내 catalase 활성도는 Aebi의 방법³⁰⁾에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소원 일정량을 넣고 기질로서 10 mM H₂O₂ 용액을 가하여 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 10 mM H₂O₂ 용액 대신에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 가해 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였으며 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μ M의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

(4) 간에서의 glutathione 함량

조직내 GSH 함량 측정은 Ellman 등의 방법³¹⁾에 따랐다. 조직 균질액을 1,000×g에서 원심분리 한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1000×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 1 mM DTNB 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 GSH 함량은 protein 1 mg 당 nmole로 나타내었다.

(5) 간에서의 glutathione-s-transferase 활성

간 조직내 GST 활성은 chlorodinitrobenzene(CDNB)과 GSH를 기질로 사용한 Habig의 방법³²⁾으로 측정하였다. 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 희석시킨 간 부유액에 1 mM GSH, 1

mM CDNB를 첨가하여 파장 340 nm에서 단백질 mg당 1분간 conjugated되는 CDNB의 nmole로 표기하였다.

(6) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법³³⁾³⁴⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 단백질을 정량하였다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 표현하고 유의성 검증은 Sigma Plot 2001(Window용 version 7.0)을 이용하여 unpaired *t-test*를 실시하였다.

Ⅲ. 實驗 成績

1. *in vivo*에서 당뇨 관련 혈청 변화

1) 혈청중 glucose 함량에 미치는 영향
 정상군에서는 86.25±15.62 mg/dl인데 비하여 대조군은 305.63±91.91 mg/dl로 3배 이상 증가하였다. 실험군의 glucose 함량은 大黃甘草飲子 192.37±55.78 mg/dl, 甘豆湯 299.63±91.26 mg/dl, 大黃甘草湯 313.49±142.74 mg/dl로 대조군에 비하여 大黃甘草飲子만 매우 유의성(p<0.01) 있게 감소하였다(Fig. 1).

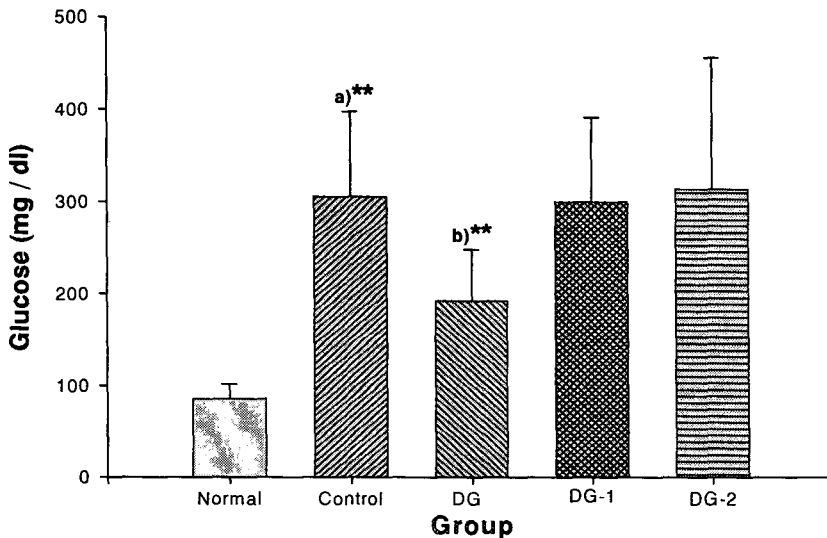


Fig. 1. Effects of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum glucose in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : p<0.01)

2) 혈청중 triglyceride 함량에 미치는 영향
 정상군에서는 98.78 ± 14.04 mg/dl 인데 비하여 대조군은 274.63 ± 62.20 mg/dl 로 약 3 배 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 215.13 ± 49.56 mg/dl, 甘豆湯 256.28 ± 39.16 mg/dl, 大黃甘草湯 274.47 ± 53.58 mg/dl 로 大黃甘草飲子만 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 2).

3) 혈청중 total cholesterol 함량에 미치는 영향
 정상군은 97.38 ± 9.79 mg/dl 인데 비하여 대조군은 148.39 ± 16.04 mg/dl 로 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 $125.75 \pm$

11.32 mg/dl, 甘豆湯 142.04 ± 20.92 mg/dl, 大黃甘草湯 149.63 ± 23.57 mg/dl 로 大黃甘草飲子만 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 3).

4) 혈청중 HDL cholesterol 함량에 미치는 영향

정상군은 42.64 ± 4.20 mg/dl 인데 비하여 대조군은 25.04 ± 4.35 mg/dl 로 감소하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 31.19 ± 6.19 mg/dl, 甘豆湯 26.17 ± 4.16 mg/dl, 大黃甘草湯 24.64 ± 5.56 mg/dl 로 大黃甘草飲子만 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 4).

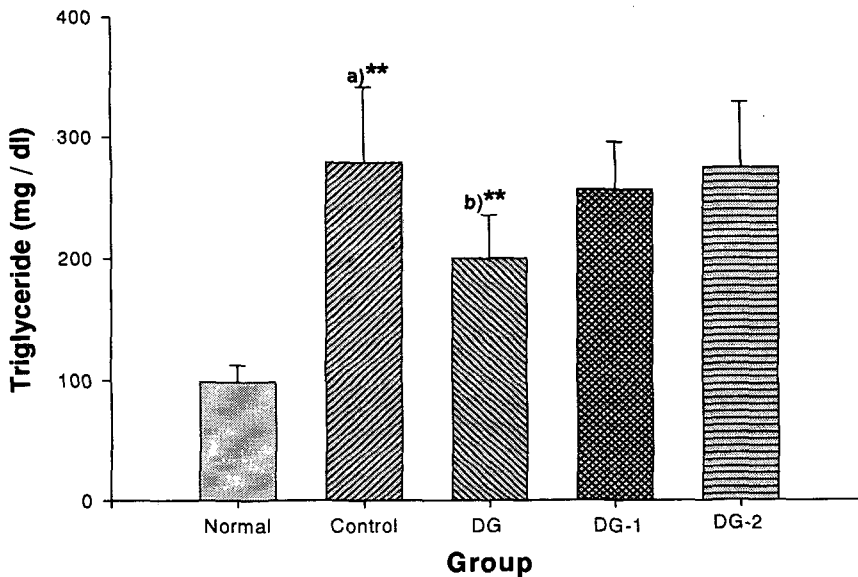


Fig. 2. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum triglyceride in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

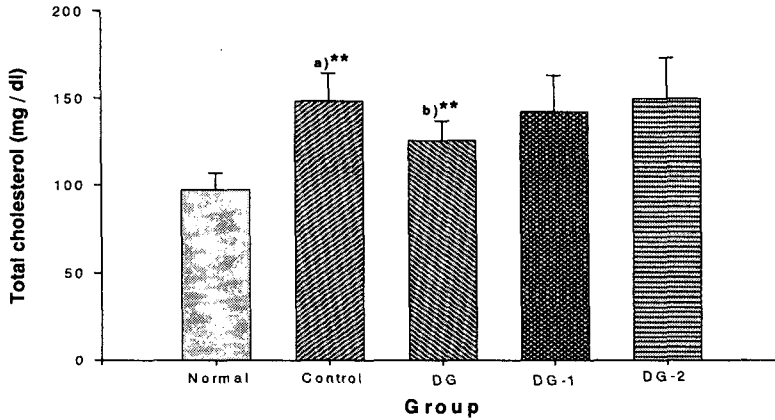


Fig. 3. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum total cholesterol in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

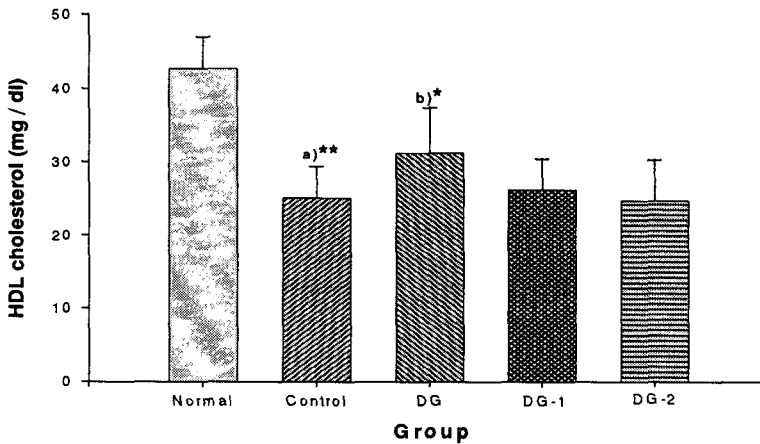


Fig. 4. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum HDL-cholesterol in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$)

5) 혈청중 total protein 함량에 미치는 영향

정상군에서는 7.07 ± 0.41 g/dl인데 비하여 대조군은 5.46 ± 0.58 g/dl로 다소 감소하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 6.32 ± 0.47 g/dl, 甘豆湯 5.61 ± 0.62 g/dl, 大黃甘草湯 5.73 ± 0.70 g/dl로 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 증가하였다(Fig. 5).

6) 혈청중 albumin 함량에 미치는 영향

정상군에서는 4.17 ± 0.18 g/dl인데 비하여 대조군은 2.84 ± 0.54 g/dl로 다소 감소하였으며, 실험군에서는 大黃甘草飲子 3.33 ± 0.43 g/dl, 甘豆湯 2.98 ± 0.42 g/dl, 大黃甘草湯 2.96 ± 0.37 g/dl로 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 6).

7) 혈청중 creatinine 함량에 미치는 영향

정상군에서는 0.94 ± 0.13 mg/dl인데 비하여 대조군은 1.55 ± 0.17 mg/dl로 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 1.37 ± 0.12 mg/dl, 甘豆湯 1.53 ± 0.11 mg/dl, 大黃甘草湯 1.61 ± 0.10 mg/dl로 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다(Fig. 7).

8) 혈청중 BUN 함량에 미치는 영향

정상군에서는 13.26 ± 2.98 mg/dl인데 비하여 대조군은 31.20 ± 6.89 mg/dl로 3배 가량 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 22.59 ± 3.37 mg/dl, 甘豆湯 28.27 ± 5.80 mg/dl, 大黃甘草湯 30.52 ± 6.49 mg/dl로 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 8).

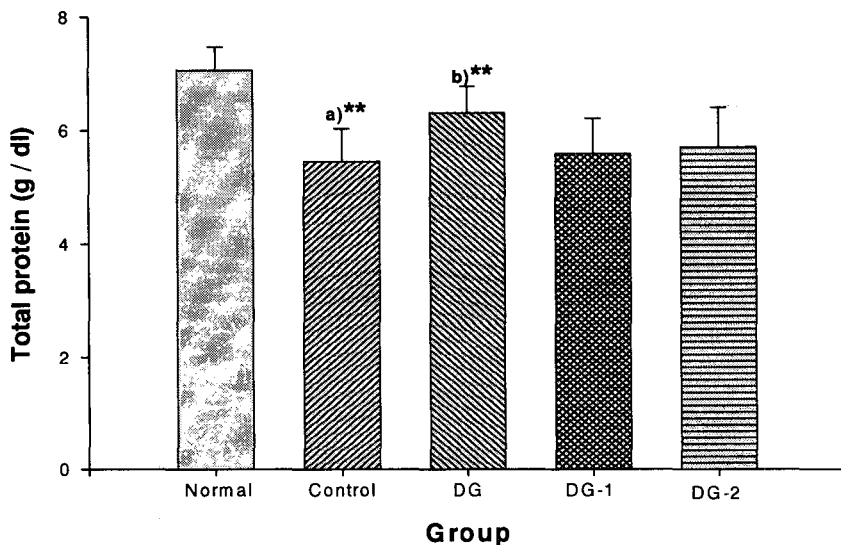


Fig. 5. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum total protein in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

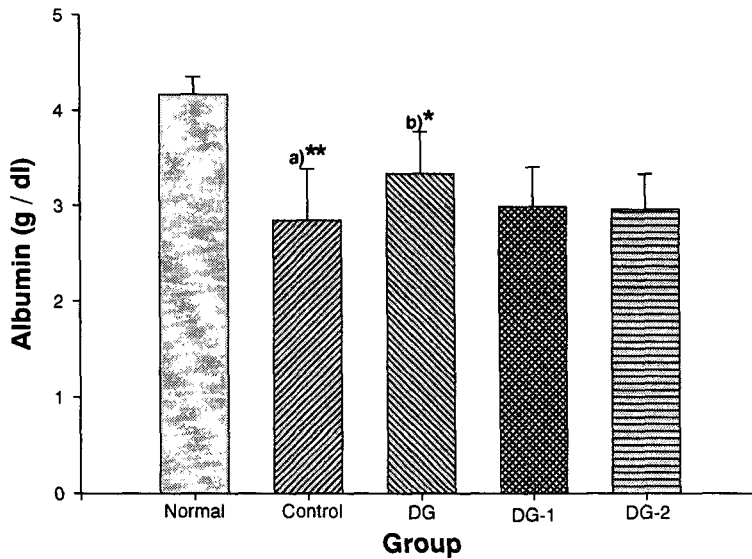


Fig. 6. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum albumin in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$)

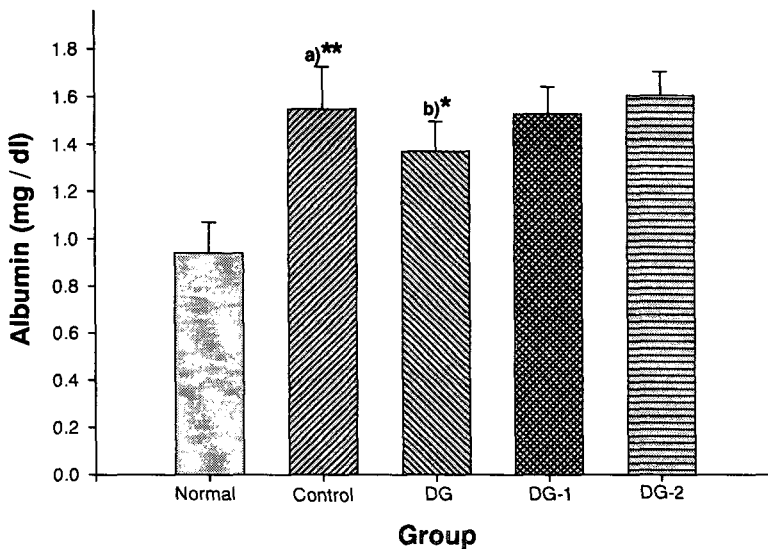


Fig. 7. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum creatinine in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$)

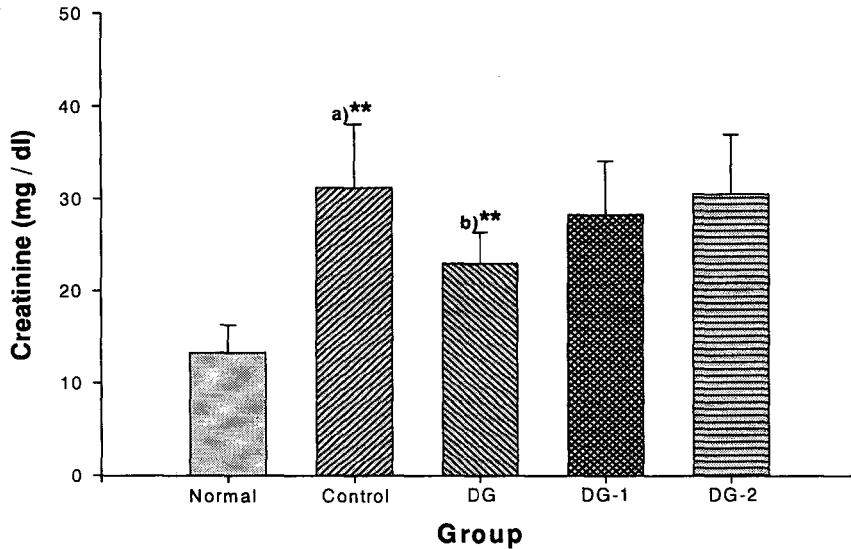


Fig. 8. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the activity of serum BUN in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

2. *in vitro*에서 자유기 소거 효과

1) 지질자동산화계에서의 항산화 효과
 불포화지방산의 일종인 linoleic acid의 자동산화계를 이용하여 농도별 추출물들의 지질과산화물 생성 억제 효과를 배양 시간 별로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서의 지질과산화물의 함량은 배양 1일째에는 거의 변화가 없었고 5일째에는 $9.23 \pm 0.98 \mu\text{M}$ 로 시간이 경과함에 따라 점점 증가하여 배양 10일째에는 $18.61 \pm 1.54 \mu\text{M}$ 로 현저한 증가를 보였다. 항산화제인 BHT, BHA 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서는 배양기간동안 거의 변화가 없었으며, 배양 10일째에 각각

0.97 ± 0.02 , 0.95 ± 0.01 , $1.11 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 지질과산화물의 생성이 현저하게 억제되었다.

이에 비하여 실험군에서는 전반적으로 농도가 높아질수록 억제 효과가 현저하게 나타났다. *大黃甘草飲子*는 배양 5일째 추출물 농도가 500, 1000, 2000, 4000 μg 일 때 각각 5.81 ± 0.09 , 2.01 ± 0.22 , 1.12 ± 0.14 , $0.45 \pm 0.22 \mu\text{M}$ 이었고, 10일째에는 11.13 ± 0.20 , 4.46 ± 0.25 , 2.37 ± 0.20 , $1.41 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 로 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 억제되었다. *甘豆湯*은 배양 5일째 추출물 농도가 1000, 2000, 4000 μg 일 때 각각 3.82 ± 0.91 , 1.98 ± 0.10 , $0.54 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 이었고, 10.40 ± 0.62 , 4.24 ± 0.28 , $1.39 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 로 나타

나 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 억제되었다. 大黃甘草湯은 배양 5일째 추출물 농도가 500, 1000, 2000, 4000 μg 일 때 3.87 ± 0.57 , 1.19 ± 0.18 , 0.99 ± 0.21 , $0.44 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 이었고, 9.77 ± 0.66 , 3.69 ± 0.40 , 2.32 ± 0.21 , $1.34 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 로 나타나 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 억제되었다(Fig. 9).

2) DPPH radical 소거 효과

각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 DPPH radical 소거효과를 관찰한 결과 대부분의 농도에서 농도 의존적인 radical 소거효과가 나타났다. 특히, 추출물 농도 4000 μg 에서 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯은 각각 94.50%, 93.42%로 매우 강력한 소거

효과가 나타났으며, 甘豆湯의 경우는 65.58%로 상대적으로 가장 낮은 효과가 나타났다(Fig. 10).

3) Xanthine-xanthine oxidase계에서 superoxide의 생성 억제 효과

각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 superoxide의 생성 억제효과를 관찰한 결과 각 추출물에서 농도 의존적인 superoxide의 생성 억제효과를 보였다. 추출물 질량 1000 μg 일 때 大黃甘草飲子 50.14%, 甘豆湯 31.24%, 大黃甘草湯 47.36%로 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯의 효과가 甘豆湯보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11).

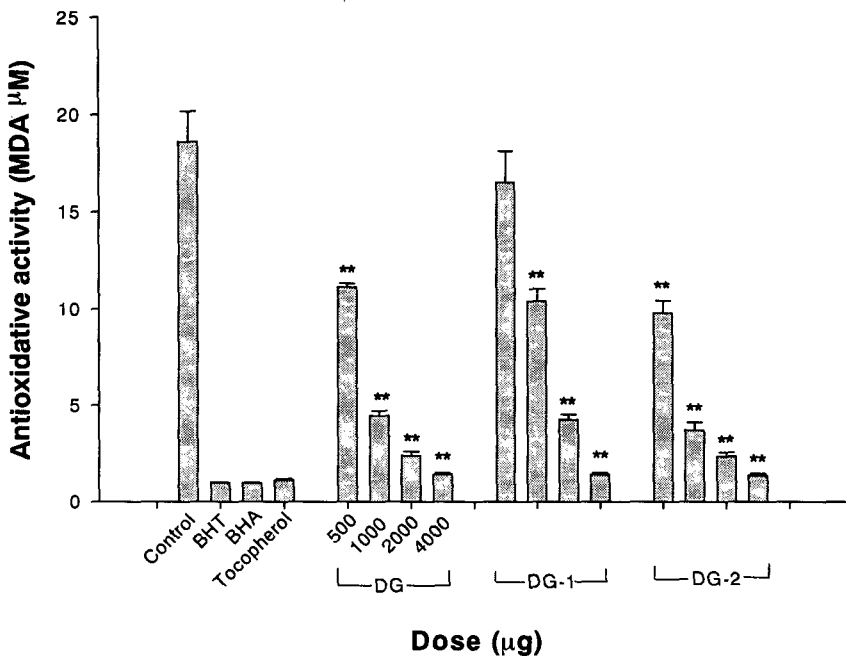


Fig. 9. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts in linoleic acid system on antioxidative activity after 10 days

Each values are the mean of triplicate experiments (** : $p < 0.01$)

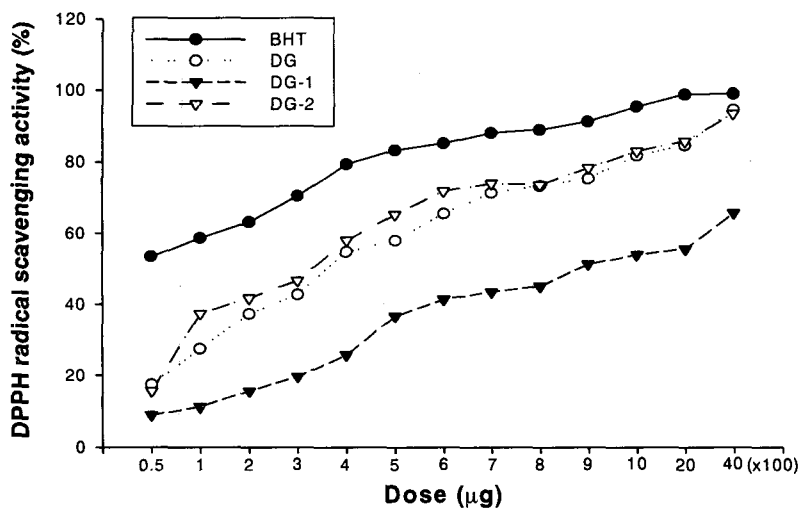


Fig. 10. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on DPPH radical scavenging activity
 *Radical scavenging activity(%) = [(control O.D. - experimental O.D.)/Control O.D.]×100
 Each values are the mean of triplicate experiments.

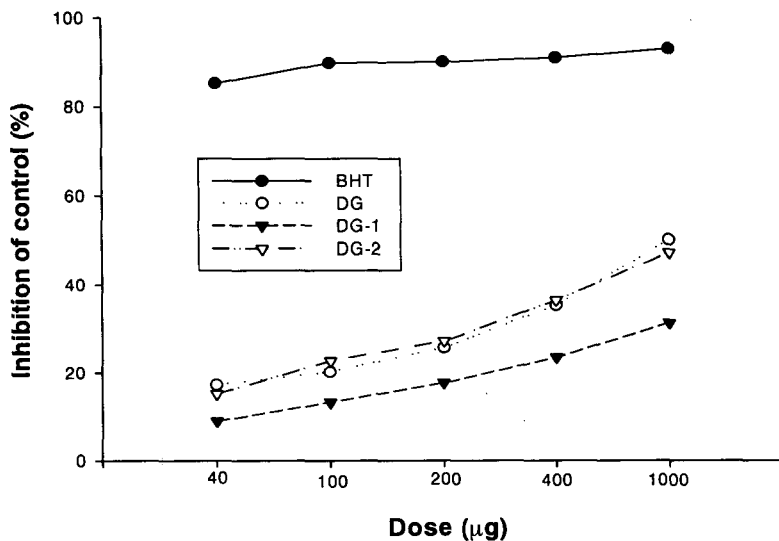


Fig. 11. Inhibitory effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on superoxide generation induced by xanthine-xanthine oxidase system
 Each values are the mean of triplicate experiments.

4) Hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응 억제 효과

Hydroxyl radical에 대한 억제 효과를 관찰해 본 결과, 대조군에서의 과산화지질의 함량은 34.12 μ M이었으나, 항산화제인 BHT를 첨가한 실험군에서는 3.09 μ M로 나타나 대조군에 비해 약 91%의 억제 효과를 보였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 모두 농도 의존적인 억제 효과를 나타내었는데, 추출물의 양이 1000 μ g일 때, 大黃甘草飲子 5.51 μ M, 甘豆湯 11.24 μ M, 大黃甘草湯 5.32 μ M로 大黃甘草飲子和 大

黃甘草湯에서 양호한 지질과산화물 생성 억제 효과가 나타났다(Fig. 12).

5) Nitrate 소거능에 미치는 영향

각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 nitrate 소거능 효과를 관찰한 결과 각 추출물에서 농도 의존적인 nitrate 소거능 효과를 보였다. 추출물 질량 1000 μ g일 때 大黃甘草飲子 69.51%, 甘豆湯 50.23%, 大黃甘草湯 72.12%로 大黃甘草飲子和 大黃甘草湯의 효과가 甘豆湯보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 13).

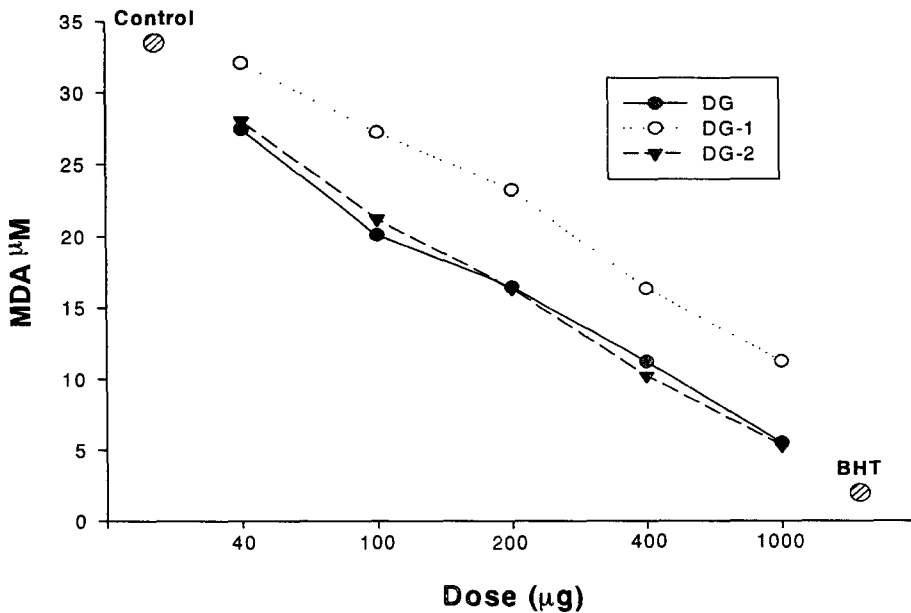


Fig 12. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on H_2O_2 - Fe^{2+} system induced lipid peroxidation in rat liver

Each values are the mean of triplicate experiments.

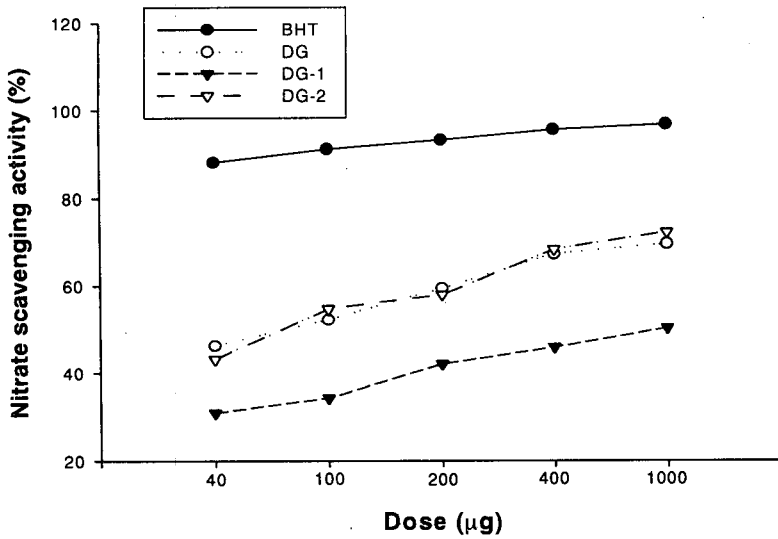


Fig 13. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on Nitrate scavenging activity. Each values are the mean of triplicate experiments.

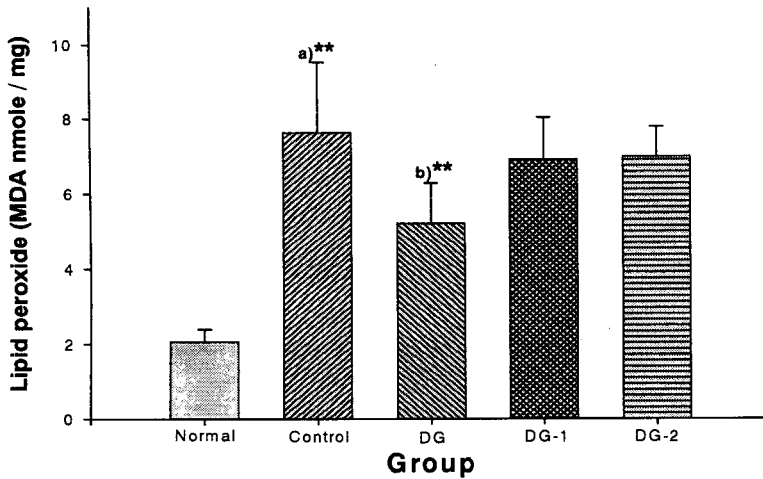


Fig. 14. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the level of serum lipid peroxide in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

3. *in vivo*에서 항산화 효과

1) 혈청중 lipid peroxide 함량에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 MDA 함량은 2.07 ± 0.33 MDA nmole/ml 인데 비해 대조군은 7.63 ± 1.90 MDA nmole/ml 으로 정상군에 비해 3배 이상 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 5.25 ± 1.03 MDA nmole/ml, 甘豆湯 6.91 ± 1.12 MDA nmole/ml, 大黃甘草湯 6.99 ± 0.79 MDA nmole/ml 으로 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 14).

2) 간에서의 lipid peroxide 함량에 미치는 영향

간에서의 과산화지질 함량을 보면 정상군에서의 함량은 10.47 ± 1.46 MDA nmole/mg 인데 비해 대조군은 32.50 ± 5.61 MDA nmole/mg 으로 3배 이상 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 23.63 ± 5.09 , 甘豆湯 29.96 ± 6.65 , 大黃甘草湯 29.84 ± 6.67 MDA nmole/mg 으로 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 15).

3) 간에서의 catalase 활성에 미치는 영향
간에서의 정상군의 catalase 활성은 10.90 ± 0.74 units/mg 인데 비해 대조군은 6.21 ± 0.96 unit/mg 으로 활성이 감소하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 8.35 ± 1.10

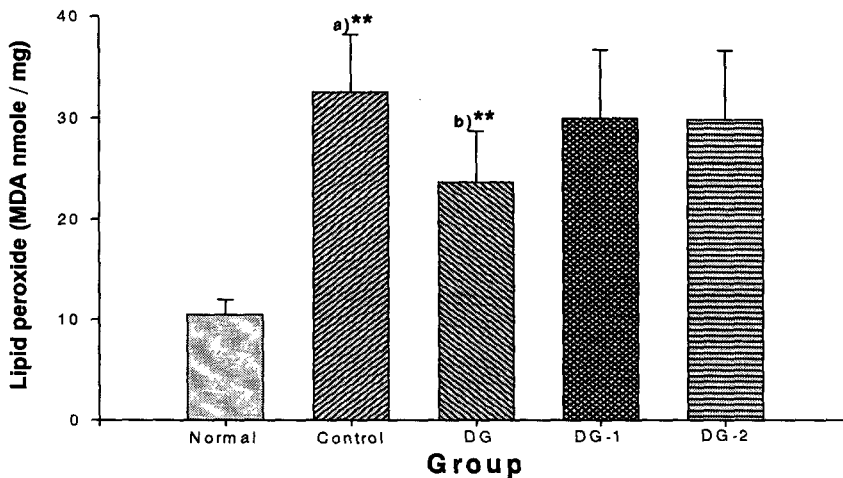


Fig. 15. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the level of serum lipid peroxide in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control(** : $p < 0.01$)

units/mg of protein, 甘豆湯 6.75 ± 0.10 units/mg, 大黃甘草湯 6.49 ± 1.11 units/mg 으로 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 증가하였다(Fig. 16).

4) 간에서의 glutathione 함량에 미치는 영향

간에서의 정상군의 GSH 함량은 19.32 ± 2.20 nmole/mg인데 비해 대조군은 15.47 ± 1.71 nmole/mg으로 감소하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 17.08 ± 1.11 nmole/mg, 甘豆湯 16.10 ± 1.42 nmole/mg, 大黃甘草湯 15.72 ± 1.24 nmole/mg으로 大黃甘草

飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 17).

5) 간에서의 glutathione-s-transferase 활성에 미치는 영향

간에서의 정상군의 glutathione-s-transferase 활성은 2.49 ± 0.13 nmole/mg인데 비해 대조군은 3.81 ± 0.44 nmole/mg으로 증가하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子 3.14 ± 0.29 nmole/mg, 甘豆湯 3.74 ± 0.38 nmole/mg, 大黃甘草湯 3.78 ± 0.67 nmole/mg으로 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 18).

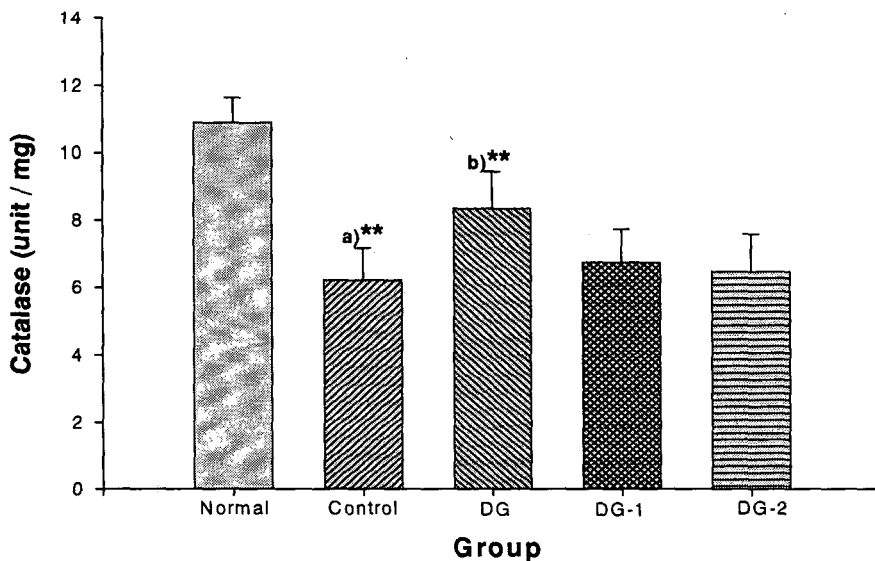


Fig. 16. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the level of hepatic catalase in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

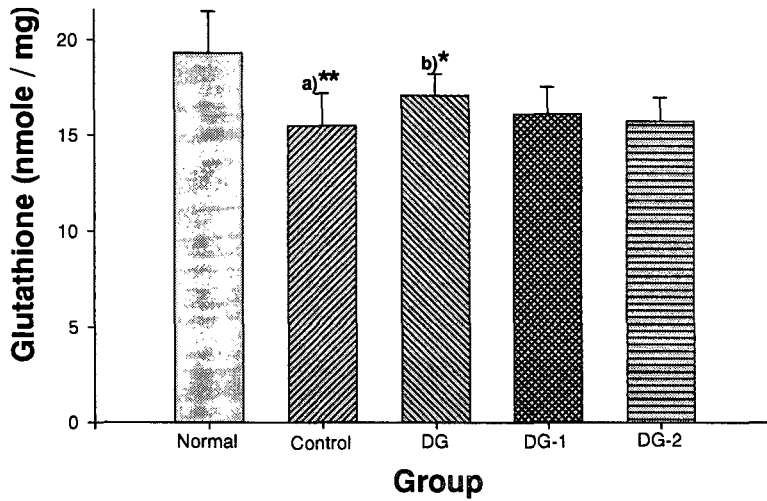


Fig. 17. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the level of hepatic glutathione in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$)

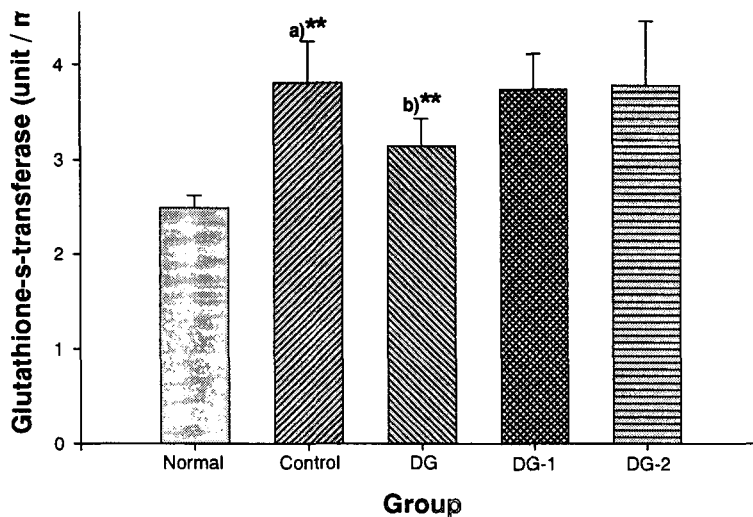


Fig. 18. Effect of the *Daehwanggamchoeumja* (DG), *Gamdutang* (DG-1) and *Daehwanggamchotang* (DG-2) extracts on the level of hepatic glutathione-s-transferase in alloxan-treated rat

a) Significantly different from normal, b) Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

IV. 考 察

인슐린의존형 당뇨병(IDDM)은 대표적 자면역질환으로서 인슐린의존형 당뇨병에서는 자가항원이 존재하는데, 이 자가항원을 인식한 T세포와 대식세포(macrophage)에서 사이토카인과 활성산소가 분비되고, 이들에 의해 췌장 β 세포의 괴사(necrosis)나 아포토시스(apoptosis)가 유도되어 발병하게 된다.^{6),35)-37)} 또한 당뇨병과 그 합병증의 발병이 활성산소와 관련성이 깊다는 것을 시사하는 증거들이 많이 제시되고 있는데, 그 기전으로는 지질과산화, DNA손상 및 단백질 산화³⁸⁾⁻⁴⁰⁾와 같은 활성산소의 일반적 세포손상기전 이외에, 염증과 관련이 깊은 전사인자인 NF- κ B의 활성화⁴¹⁾ 등이 제시되고 있다.

Alloxan은 $C_4H_2N_2O_4$ 의 강한 산화력 화합물로서 췌장 β 세포 내의 SH기 의존 ATPase를 특히 예민하게 억제, 소실시켜 세포손상을 야기하고 이로 인해 인슐린 결핍을 초래하여 당뇨병을 유발시킨다. Alloxan의 이러한 선택적 β 세포파괴는 정확한 기전이 밝혀지지 않았지만, Alloxan의 구조가 glucose와 매우 유사하여 췌장과 간과 같은 glucose대사와 관련된 장기에 선택적으로 흡입된다. Alloxan이 이들 장기에 흡입된 후, 대사과정을 통해 활성산소가 발생하게 되는데, 항산화효소가 풍부한 간과는 달리 췌장에는 항산화효소가 부족하여 alloxan으로 인한 췌장세포의 선택적 파괴가 발생한다.⁸⁾ 또한, alloxan은 췌장에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 간과 신장과 같은 다른 장기에 작용하여 손상을 입히는 것으로 보고되고 있다.⁴²⁾

활성산소종(reactive oxygen species)은 산소라디칼(oxygen free radicals) 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물들을 통칭하는 것으로 superoxide radical($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 등이 있는데, 이들은 모두 반응성이 높은 특징을 가지고 있다. 프리라디칼(free radicals)이란 화학적으로 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 전자를 지닌 원자나 분자를 의미한다. 이들은 쌍을 이루고 있지 않는 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자를 하나 더 얻어 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있기 때문에 불안정하고 높은 반응성을 갖는다.

활성산소들(reactive oxygen species)은 체내 각종 세포들의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되고 있는데, 그 예로 미토콘드리아의 전자전달계, peroxisome의 지방산 대사과정, cytochrome p-450 반응 그리고 포식세포들(neutrophils, eosinophils, monocytes, macrophages)에 의한 respiratory burst 과정 등을 들 수 있다. 활성산소는 반응성이 높기 때문에 주변의 어떤 물질들과도 쉽게 반응하는데, 주로 지질의 산화, DNA의 산화적 손상, 단백질의 산화적 손상을 일으킨다. 이러한 활성산소의 반응성에 대응하여 인체에는 정교한 항산화 방어체계가 발달되어 있는데, SOD, catalase, GSHpx 등이 있다.⁹⁾¹⁰⁾ 이러한 생체방어기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스가 야기되고, 이로 인해 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용

을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병, 동맥경화, 피부질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 당뇨병과 당뇨병 합병증도 활성산소와 관련이 깊은 질병이라는 것이 밝혀져 항산화제를 통한 당뇨병 치료가 연구되고 있다.¹²⁾

大黃甘草飲자는 金代 劉完素의 「黃帝素問宣明論方·燥門」¹⁾에 消渴을 치료하는 처방으로 기록되고 있으며, 「東醫寶鑑·消渴門」²⁾에서도 消渴通治藥으로 기록되어 있다. 그 약물 구성을 보면 大黃, 甘草, 大豆의 3味로 구성되는데, 甘豆湯과 大黃甘草湯을 合方한 형태로 구성되어 있다. 현대 약리학의 연구에 의하면 大黃은 면역 조절작용과 소염작용이 있고, 甘草는 glucocorticoid 유사작용으로 소염작용을 하며⁴³⁾⁴⁴⁾, 大豆는 Isoflavones와 같은 항산화 효과를 가진 성분이 있다는 것이 밝혀졌다⁴⁵⁾. 대황, 감초, 대두의 항산화작용과 당뇨에 관한 연구논문들¹³⁾⁻¹⁵⁾에서도 대황, 감초, 대두에 항산화작용이 있는 것으로 보고되고 있다.

消渴이란 消穀善飢하면서 渴而多飲하는 병증으로 消란 태운다는 뜻이고, 渴은 입이 마른다는 뜻이다. 消渴은 병증에 따라 3종으로 분별할 수 있는데, 첫째 消穀善飢하면서 체중이 점점 감소하여 口渴하는 증으로 당뇨병, 尿崩證에 해당하고, 둘째 多渴多尿하는 주증으로 腎性尿崩과 萎縮腎 등에 해당하며, 셋째 口渴이 주증으로 一過性 多飲, 精神的 多飲에 해당된다. 또한 消渴은 증상의 편중, 발현하는 부위에 따라 上消, 中消, 下消의 三消로 구분하고 있는데, 당뇨병은 이 중 中消와 가장 유사한 병증이라고 볼 수 있다.⁴⁾

이와 같이 消渴의 증상과 당뇨병의 발현 증상의 유사성 때문에 한의학에서는 당뇨병을 消渴에 범주에 배속시켜 치료에 접근하고 있고, 이들 3가지 약물들의 약리작용으로 볼 때 大黃甘草飲자는 소염작용과 항산화작용으로 당뇨병 및 그 합병증에 유효할 것으로 추정하였다. 이에 본 논문에서는 消渴처방 중에서 지금까지 실험된 바가 없는 大黃甘草飲자와 그 구성약물들의 당뇨병에 대한 유의성과 항산화 방어제와의 관련성을 파악하고자 alloxan으로 당뇨를 유발한 백서에 大黃甘草飲자(DG)와 甘豆湯(甘草大豆群; DG-1) 그리고, 大黃甘草湯(DG-3)의 3가지 약물군을 각각 투여한 후 그 결과를 관찰하였다.

인슐린이 부족한 당뇨병에서는 포도당 대사 뿐 아니라 지방 및 단백질 대사에도 영향을 미쳐 모세혈관병증, 망막병증, 신장병증 및 신경병증 등과 같은 합병증이 발생하게 된다.⁵⁾ 糖尿病으로 인한 대사장애를 관찰하기 위하여 탄수화물 대사의 기본 물질인 glucose의 함량, 지방 대사와 관련된 triglyceride · HDL cholesterol · total cholesterol 함량, 단백질 대사와 관련된 albumin · total protein 및 신장기능과 관련된 creatinine · BUN 함량 등을 측정하였다.⁴⁶⁾⁻⁴⁸⁾

탄수화물 대사를 관찰하기 위해 흰쥐의 혈청 중 glucose 함량 측정 결과, 실험군의 glucose 함량은 대조군에 비하여 大黃甘草飲자만 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다.

지방대사를 관찰하기 위해 혈청 중 triglyceride 함량 측정 결과, 실험군에서 大黃甘草飲자만 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였고, 혈청 중 total cholesterol 함량 측

정 결과, 실험군에서 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다. 또한 혈청 중 HDL cholesterol 함량 측정 결과, 실험군에서 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다.

단백질 대사를 관찰하기 위해 혈청 중 total protein 함량 측정 결과, 실험군에서 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다. 혈청중 albumin 함량 측정 결과에서도 실험군에서 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다.

신장기능을 관찰하기 위해 흰쥐의 혈청 중 creatinine 함량 측정 결과, 실험군에서 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다. BUN 함량 측정 결과에서도 대황 감초음자만 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다.

이상의 당뇨병으로 인한 대사장애와 관련된 혈청 실험에서 大黃甘草飲子만 유의성 있는 효과를 나타내어 糖尿病으로 인한 대사장애에 대한 일정한 치료 효과가 있음을 시사하였다. 構成藥物群에서는 유의성 있는 효과를 나타내지 못 하였는데, 이는 大黃甘草飲子 구성약물들의 복합적 작용에 의해 효력이 발생하는 것으로 추정된다.

糖尿病에서 지질과산화에 의하여 조직이 손상될 수 있으므로⁴⁹⁾ 지질과산화물과 자유기의 소거 효과를 측정하기 위하여 *in vitro*에서 과산화물 생성 억제 효과 · DPPH radical 소거 효과 · superoxide 생성 억제 효과 · hydroxy radical에 의한 지질과산화 반응 억제 효과 · Nitrate reductase 소거능에 미치는 영향을 측정하였다.

지질과산화물의 생성은 세포막 인지질을 구성하는 불포화지방산의 이중결합 부위에

superoxide radical, hydroxy radical 등이 수소를 탈취하여 fatty acid radical을 생성하며 이는 다시 산소분자와 결합하여 peroxy radical을 생성하고 이는 다시 인접한 부위에 있는 탄화수소와 연쇄적으로 반응하여 지질과산화물을 형성한다.⁵⁰⁾ 불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화계를 이용하여 지질과산화물 생성 억제 효과를 관찰한 결과, 大黃甘草飲子는 배양 10일째 추출물 농도가 500, 1000, 2000, 4000 μg 일 때 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 억제되었다. 甘豆湯은 배양 10일째 추출물 농도가 1000, 2000, 4000 μg 일 때 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 억제되었다. 大黃甘草湯 역시 배양 10일째 추출물 농도가 500, 1000, 2000, 4000 μg 일 때 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 억제되었다.

DPPH radical은 반응성이 강하여, 항산화제로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물로 전환하는 것으로 알려져 있다.⁵¹⁾⁵²⁾ 각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 DPPH radical 소거효과를 관찰한 결과, 대부분의 농도에서 농도 의존적인 radical 소거효과가 나타났다. 특히, 추출물 농도 4000 μg 에서 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯은 각각 94.50%, 93.42%로 매우 강력한 소거 효과가 나타났으며, 甘豆湯의 경우는 65.58%로 상대적으로 가장 낮은 효과가 나타났다.

Superoxide는 생체내의 방어기전에 중요한 역할을 담당하지만 지질과산화반응을 유발시킬 뿐만 아니라 더 반응성이 높은 hydroxy radical을 생성시키는 전구물질이 되기도 한다⁵³⁾. 각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 superoxide의 생성 억제효과를 관찰한 결과 각 추출물에서 농도 의존

적인 superoxide의 생성 억제효과를 보였다. 추출물 질량 1000 μ g일 때 大黃甘草飲子 50.14%, 甘豆湯 31.24%, 大黃甘草湯 47.36%로 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯의 효과가 甘豆湯보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다.

Hydroxy radical은 superoxide anion 및 hydrogen peroxide 등의 활성산소에 비하여 활성이 훨씬 강하여 생체 세포막의 지질과산화 반응을 개시하며 세포막 및 거대분자에 대한 직접적 손상을 일으키는 주된 free radical로 알려져 있다⁵⁴. Hydroxy radical에 대한 억제 효과를 관찰해 본 결과, 실험군에서는 대조군에 비하여 모두 농도 의존적인 억제 효과를 나타내었는데, 추출물의 양이 1000 μ g일 때, 大黃甘草飲子 5.51 μ M, 甘豆湯 11.24 μ M, 大黃甘草湯 5.32 μ M로 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯에서 양호한 지질과산화물 생성 억제 효과가 나타났다.

Nitrate는 아민류와 nitroso화 반응으로 nitroamine을 생성하는데 이는 동물실험결과 대부분 발암성 물질로 밝혀졌다²⁸. Nitrate 소거능에 대한 관찰결과, 각 추출물에서 농도 의존적인 Nitrate reductase 소거능효과를 보였다. 추출물 질량 1000 μ g일 때 大黃甘草飲子 69.51%, 甘豆湯 50.23%, 大黃甘草湯 72.12%로 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯의 효과가 甘豆湯보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다

이상의 *in vitro* 실험 결과로 보아 大黃甘草飲子와 大黃甘草湯이 甘豆湯에 비해 free radical 소거 효과가 높은 것으로 나타났다.

Alloxan 투여 및 糖尿病에 의하여 과산

화 반응이 진행되면 자유기 생성 및 과산화물에 의한 조직 손상이 나타나므로⁴⁹ *in vivo*에서 항산화와 관련된 lipid peroxide의 함량 · catalase 활성 · Glutathione 함량 · GST 활성 등을 측정하였다.

Lipid peroxide는 세포막의 지질성분이 산화되어 나타나는 반응산물이므로, 생체 조직중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용된다.⁵⁵⁾⁵⁶ 혈청에서의 정상군의 MDA 함량에 비해 대조군은 3배 이상 증가하였고, 실험군에서는 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다. 또한, 간에서 정상군의 과산화지질 함량에 비해 대조군은 3배 이상 증가하였고, 실험군에서는 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다.

Catalase는 세포내 존재하는 항산화효소로서, H₂O₂를 분해하여 제거하는 작용을 가진다.⁵⁷ 간에서의 정상군의 catalase 활성은 10.90 \pm 0.74 units / mg of protein인데 비해 대조군은 6.21 \pm 0.96 unit / mg of protein으로 활성이 감소하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 증가하였다.

Glutathione은 외부에서 유입된 유독물질과 포함반응을 하여 체외로 배출시키므로,⁵⁸⁾⁵⁹ 독성물질에 대한 생체의 방어능력을 간접적으로 측정할 수 있는 기준이 될 수 있다. 간에서의 정상군의 GSH 함량은 19.32 \pm 2.20 nmole / mg of protein인데 비해 대조군은 15.47 \pm 1.71 nmole / mg of protein으로 감소하였다. 실험군에서는 大黃甘草飲子만 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다.

Glutathione-s-transferase는 독성물질을 해독하며, 이중 생리물질을 체외로 배설하는 작용을 촉매하며 organic hydroperoxide를 peroxidation하여 지방산화를 방지하며 세포의 내성을 증가시키는 중요한 작용을 한다.⁶⁰⁾⁶¹⁾ 간에서의 정상군의 glutathione-s-transferase 활성은 2.49 ± 0.13 nmole / mg of protein인데 비해 대조군은 3.81 ± 0.44 nmole / mg of protein으로 증가하였다. 실험군에서는 甘豆湯만 매우 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다.

이상에서 *in vivo*에서의 항산화 방어계에 미치는 영향을 살펴본 바 실험군들 중 大黃甘草飲子만 간기능을 일정하게 개선시키며, 또한 항산화계에서의 효소 활성화 및 지질과산화물 제거에 일정한 영향을 미치는 것으로 보여진다.

결론적으로 실험군들 중 大黃甘草飲子만 *in vitro*와 *in vivo*에서 항산화작용과 Alloxan으로 유도된 糖尿病에 치료작용이 있는 것으로 나타났고, *in vitro*에서 항산화작용은 大黃甘草飲子和 大黃甘草湯이 甘豆湯에 비해 상대적으로 높게 나왔다. Alloxan은 활성산소를 발생시켜 당뇨병을 유도하는 것으로 알려져 있는데, 이와 같은 관점에서 보면 大黃甘草飲子の 항산화능력이 Alloxan으로 유도된 당뇨병 치료에 작용한 것으로 보인다. 또한 약물군으로 나눈 실험결과 大黃甘草飲子の 치료작용은 大黃, 甘草, 大豆 3가지 약물이 함께 작용할 때 생기는 상승·복합작용으로 효과가 나타남을 시사하고 있다. 大黃甘草飲子是 활성산소와 관련된 인슐린의존성 당뇨병에 일정한 치료효과가 있을 것으로 사료되는 바, 향후 본 연구를 바탕으로 이에 대한 구체적인 실험적 연구가 진행되어야 할 것

으로 생각된다.

V. 結 論

大黃甘草飲子の 糖尿病과 관련된 혈청변화와 자유기 소거능, 항산화 방어계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Alloxan으로 유도된 高血糖 白鼠에 大黃甘草飲子(DG)와 그 構成藥物群인 甘豆湯(甘草大豆群; DG-1), 大黃甘草湯(DG-2)를 투여하여 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 당뇨관련 혈청변화(Glucose, Triglyceride, Total Cholesterol, HDL Cholesterol, Total Protein, Albumin, Creatine, BUN)에서 大黃甘草飲子(DG)가 유의성을 나타내었다.
2. *In vitro* 상의 항산화 효과(the suppressing effect on peroxidation of linoleic acid on concentration, the scavenging effect of DPPH radical, inhibitory effect of superoxide in xanthine-xanthine oxidase system, inhibitory effect on lipid peroxidation reaction by hydroxy radical in $H_2O_2-Fe^{2+}$ system, and the effect on Nitrate reductase activity)에서 大黃甘草飲子(DG)와 大黃甘草湯(DG-2)이 甘豆湯(DG-1)에 비해 상대적으로 높은 효과를 나타내었다.
3. *In vivo* 상의 항산화 효과(The level of serum LPO, The level of hepatic LPO, Catalase, GSH, GST)에서 大黃甘草飲子(DG)가 유의성을 나타내었다.

실험약물군 중 大黃甘草飲子(DG)만 糖尿病과 관련된 탄수화물, 지방, 단백질의 대사장애에 대한 개선 및 신장의 기능 회복에 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 또한 *in vitro*에서의 free radical 소거효과와 *in vivo*에서의 항산화 효소의 활성화 및 지질과산화물 생성 억제효과에서도 현저한 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

이것을 통하여 보아 大黃甘草飲子(DG)가 糖尿病 치료에 일정한 효과가 있음을 알 수 있었고, 그 기전에는 항산화작용이 크게 작용한 것으로 추정할 수 있었다. 大黃甘草飲子(DG)의 구성약물들을 실험군으로 나누어 행한 실험군 비교실험에서 다른 실험군에 비해 大黃甘草飲子(DG)만 糖尿病관련 대사장애 및 항산화작용에 유의성이 관찰되고 있는 바, 大黃甘草飲子(DG)의 항산화작용과 糖尿病 치료작용에 大黃, 甘草, 大豆 3가지 약물들의 복합·상승작용이 관여한 것으로 추정되는데, 앞으로 이에 대한 기전 연구가 더욱 필요하다고 사료된다.

參 考 文 獻

1. 주희반: 금원사대가의학전서,천진,천진과 학기술출판사,pp85-86,1994.
2. 허준: 동의보감,서울,여강출판사,pp1856-1879,1994.
3. 사문광: 중의배방학,북경,중국의약과학출판사,p51,2000.
4. 두호경: 동의신계내과학,서울,동양의학연구원출판부,pp1131-1141,1988.
5. 서울대 의과대학 내과학교실: 최신지견 내과학,서울,군자출판사,p788,1997.
6. 대한병리학회: 병리학, 서울, 고문사, pp149-150, 722-728,2000.
7. Ho E, Bray TM. Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis. Proc Soc Exp Biol Med. 1999 Dec;222(3):205-13.
8. Ho E, Chen G, Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against Alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. FASEB J. 1999 Oct;13(13):1845-54.
9. 한복기. 노화과정에서 활성산소의 역할, 생명공학동향. 1998;6(2):9-14.
10. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. Pulm Pharmacol Ther. 2001; 14(6):409-20.
11. 김종평,유익동. 노화억제를 위한 항산화제 연구, 생명공학동향. 1998;6(2): 25-36.
12. Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. J R Soc Health. 2002 Mar;122(1):28-34.
13. 김윤정: 대두 유리 Pinitol이 당노취의 혈당과 항산화 효소계에 미치는 영향, 서울대학교 석사학위논문, 2002.
14. 오성준, 백남인, 김해영: 대황뿌리의 항산화 활성물질, Piceatannol, 한국농화학회지, 2001.
15. 김형환 외: 사군자탕에서 감초의 항산화제로서의 역할, 대한본초학회지, 1999.
16. Miwa. I., Toyoda Y. and Okuda J.: J. of Medical Technology, 22:1232, 1978.
17. 木村正康, 鈴木 潤: 和漢藥심포지엄, 日

- 本, 富山醫科藥科大學和漢藥研究所, 14: 121, 1971.
18. Van Handel, E. and Zilversmit, D.B.: *J. Lab. and Clin. Med.*, 50:152, 1957.
 19. Ellesfson, R.D. and Caraway, W.T.: Ch, 10, Lipids and Lipoproteins, in *Fundamentals of Clinical Chemistry*, (Tietz, N.W.ed), W.B. Saunders, Philadelphia, 1976.
 20. Mizuta, I., Toyoda, Y. and Okuda, J.: *Journal of Medical Technology*, 22:1232, 1978.
 21. Dumas, B. T., Watson, W. A. and Biggs, H.G.: *Clin. Chem. Acta.*, 8:810, 1963.
 22. Miller, B.F. and Dubos, R.: *Studies on the presence of creatinine in human blood*, *J. Bio. Chem.*, 121:447, 1937.
 23. 齊藤正行: *臨床検査*, 日本, 8:878, 1965.
 24. Chaney, A. L. and Marbach, E.P.: *Clin. Chem. Acta.*, 8:810, 1963.
 25. Osawa, T., Namiki, M.: A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* 45:735-739, 1981.
 26. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.: Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 95:351-358, 1978.
 27. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T.: Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2090-2097, 1988.
 28. Gray, J. I. and Dugan, J. L. R. Inhibition of N-nitrosoamine formation in model food system. *J. foo. Sci.* 40:981,1995
 29. Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., and Yagi, K.: Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease. *Clin. Chim. Acta.* 79:267-770, 1977.
 30. Aebi, H.: In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U. eds.), New York, Academic press. pp.674-678, 1974.
 31. Ellman, G. L.: Tissue sulfhydryl group, *arch. Biochem. Biophys.*, 82:70-77, 1959.
 32. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferase; the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139, 1974.
 33. Lowry, O. H., Rosehrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. chem.*, 193:265-275, 1951.
 34. Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstrein: *Protein Method*, New York, Wiley, pp.55-56, 1991.
 35. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol.* 1998 Apr 15;55(8):1139-49.

36. Santamaria P. Effector lymphocytes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2001 Dec;13(6):663-9.
37. Freiesleben De Blasio B, Bak P, Pociot F, Karlsen AE, Nerup J. Onset of type 1 diabetes: a dynamical instability. *Diabetes.* 1999 Sep;48(9):1677-85.
38. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 1999 May;53(4):169-80.
39. Sytze Van Dam P. Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002 May-Jun;18(3):176-84.
40. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy.* 2000;101(10):541-51.
41. Park BH, Park JW. The protective effect of *Amomum xanthoides* extract against Alloxan-induced diabetes through the suppression of NFkappaB activation. *Exp Mol Med.* 2001 Jun 30;33(2):64-8.
42. M C S, K S, Kuttan R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2002 ;83(1-2):109-116.
43. 왕본양: 현대중약약리학, 천진, 천진과학기술출판사, pp368-374, 1997
44. 김호철: 한약약리학, 서울, 집문당, pp174-177, 434-437, 2001
45. Lichtenstein AH. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J Nutr.* 1998 Oct;128(10):1589-92.
46. 醫學教育研究院篇: 症狀別臨床檢査, 서울, 서울대학교출판부, pp.12, 50, 379, 1991.
47. 理工産業編輯部篇: HANDY 臨床檢査法, 서울, 理工産業, pp.191, 202, 227-230, 1973.
48. 김순호 손한철 이은엽 장철훈: 최신임상검사진단학, 서울, 쏙쑤文化社, pp.109-111, 1996.
49. Steinberg, D, Parhtasarathys, Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.: Modification of low-density-lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med.* 320:915-924, 1989.
50. 尹哲浩 外: 환쥐의 肝組織에서 鹿茸藥 鍼製劑의 抗酸化作用에 관한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(2):191-202, 1996.
51. 裴基采: 高麗人蔘, 高麗紅蔘 및 total saponin의 抗酸化 作用, 大田大學校大學院, 1997.
52. 文振榮 外: 柴胡가 free radical에 의한 脂質過氧化物 生成에 미치는 效果. 東國論文集自然科學篇, Vol.15:361-375, 1996.
53. Lowry, O. H., Rosehrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. chem.*, 193:265-275, 1951.
54. 金永坤 金永杓: 프리라디칼, 서울, 麗文閣, pp.64-65, 1997.
55. David, R.: Mechanistic toxicology; A

- radical perspective. J.P. harm. pharmacol., pp.41, 505-511, 1989.
56. Barry, H.: Oxidants and human disease : Some new concepts, FASEB. J., pp.1, 358-364, 1987.
57. Ross D and Moldeus P: Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: Membrane Lipid Oxidation, ed. by Vigo-Pelfrey C., Vol II, CRC Press, Boston, pp.151-170, 1993.
58. Boyland, E. and Chasseud, L. F.: The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. ADV. Enzymol., 32:173-219, 1969.
59. Ross, D.: Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. Pharmacol. Ther., 37(2): 231-239, 1988.
60. Armstrong, R. N.: Glutathione S-transferases: Structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. Adv. Enzymol. 69:1-44, 1994.
61. Hayes, J. D., T. J. Mantle, and C. B. Pickett.: Glutathione-s-transferase and drug resistance. Taylor and Francis. London. 1990.