

珍糖元의 고혈당 조절 작용 및 기전에 관한 연구

김형준, 윤철호, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Jindangwon extract in streptozotocin-induced diabetic rats

Hyung-Jun Kim, Cheol-ho Yoon, Ji-Cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective : Diabetes is a disease in which the body does not produce or properly use insulin. Etiological studies of diabetes and its complications showed that oxidative stress might play a major role. Therefore, many efforts have been made to regulate oxygen free radicals for treating diabetes and its complications. Because *Jindangwon* has been known to be effective in treatment of diabetes, the methanol extract of *Jindangwon* was tested for its effectiveness in reducing the oxidative stress induced by Streptozotocin.

Methods : *Jindangwon* was washed, dried in the shade and crushed. The crushed *Jindangwon* was extracted 3 times, each time with 3 volumes of methyl alcohol at 60°C for 24 hours. The extract was filtered and evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator to yield 30.6 g. *Jindangwon* extract was oral-administered to the diabetic rats induced by streptozotocin 50 mg per 1 kg of body weight for 15 days. The efficacy of the *Jindangwon* extract was examined with regard to the enzymatic pathways involved in the oxygen free radical production and the glutathione balance.

Results : The effects of the methanol extract of *Jindangwon* in streptozotocin-induced diabetics rats with regard to body weight, blood glucose level, hepatic lipid peroxide level, hepatic xanthine oxidase activity and type conversion rate, hepatic glutathione level, hepatic glutathione peroxidase activity, hepatic glutathione reductase activity, hepatic aldose reductase activity, and hepatic sorbitol dehydrogenase activity were favorable enough to suggest that it is a cure for diabetes and its complications.

Conclusions : These results support *Jindangwon* as an effective reducing agent for oxidative stress in the tissues and organs by regulating the production of oxygen free radicals. *Jindangwon*, in particular, shows promising results for its use as a cure, or preventative medicine for diabetes and its complications by reducing oxidative stress in beta-cells of the pancreas.

Key Words: *Jindangwon*, aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, diabetes, streptozotocin

1. 緒 論

당뇨병은 체중에서의 인슐린 분비 부족이나 분비

된 인슐린의 체내에서 작용 결함으로 인한 고혈당에 의해 시간이 경과함에 따라 많은 합병증을 야기하는 만성질환이다¹⁾. 당뇨병의 빈도는 전 인구의 2-4%를 차지하는데 전반적인 말초혈관 병변에 의해 거의 모든 장기에 병변을 유발시킨다. 당뇨병에서의 망막 병성은 성인에서의 실명에 가장 큰 요인이 되며 심근 경색은 정상인에 비해 2-3배의 높은 빈도를 보이고, 당뇨병 환자에서 하지 혈액순환 장애로 인한 하지

· 접수 : 2004년 4월 28일 채택 : 2004년 5월 18일
· 교신저자 : 정지천, 서울시 강남구 논현1동 37-21 동국대학교
강남한방병원 1내과
(Tel : 02)3416-9731, Fax : 02)3444-9171, E-Mail :
jjch@hitel.net

절단은 약 10%대에 이른다고 한다.

당뇨병과 합병증의 발병 기전은 여러 가지 인자가 관여하고 있어서 정확하게 설명할 수 없으나 가장 주목받는 대표적인 발병 인자 중의 하나로 oxidative stress를 들 수 있다^{4,7}. Oxidative stress는 활성이 강하고 친핵성의 경향이 뛰어나 조직이나 세포에 치명적인 영향을 줄 수 있는 oxygen free radical에 의해서 나타나는 반응이다⁸. 췌장의 β -cell 파괴 과정에 oxygen free radical이 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 고혈당 상태가 지속되면 비정상적인 당 대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 한층 가속화시킨다⁸. 그러므로 oxygen radical들을 효율적으로 조절할 수 있는 방법을 찾아내어 당뇨병을 극복하려는 시도가 임상에서 많이 이루어지고 있다.

東洋醫學에서 당뇨병은 消渴의 범주에 속하는데, 陰津이 虧損하여 潮熱이 内生하는 것을 기본 병인으로 하며 清熱,生津,止渴, 및 滋陰 등의 治法이 기본적으로 활용되고 있다^{10,12}. 지금까지 消渴의 치료에 활용되는 약재와 처방들에 대한 실험적 연구는 많이 보고되었으나 혈당, insulin 및 혈청 중 효소들의 변화 또는 췌장 β -cell의 조직학적인 변화를 살펴본 것이 대부분이다^{13,14}. 中醫에서도 당뇨병 과정 중에 oxygen free radical이 많이 발생하고 당뇨병의 치료에 oxygen free radical을 소거시키는 약물이 필요하다고 하였다¹⁵. 그런데 당뇨병의 합병증 발생에 관여하는 oxidative stress에 대한 연구는 보이지 않는다.

珍糖元은 임상에서 당뇨병의 치료에 많이 활용되고 있는 경험방으로¹⁶, 실험 연구에 의하면 혈중 glucose 및 지질 함량 억제 효과를 나타내었고¹⁷, 당 대사와 당 운반 및 인산화에 관여하여 당뇨병 치료에 효과를 나타내는 것으로 보고하였다¹⁸. 당뇨병의 혈관 및 신경 합병증이 유발되는데 瘀血이 관여하며^{19,20}, 珍糖元의 주된 구성 약물인 蟾蜍는 강한 活血化瘀 효능을 가지고 있다²¹.

따라서 저자는 珍糖元이 oxidative stress와 관련하여 당뇨병 합병증의 치료에 효과를 나타내는지를 검토하고자 흰쥐의 간 조직 중의 oxygen free radical 생성계 효소 및 glutathione을 매개하는 소거 기구와 관

련된 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

珍糖元의 약재는 시중에서 상등품을 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 분량은 16¹⁶에 근거하여 아래와 같이 하였다 (Table 1).

Table 1. Composition of Jindangwon

약재	생약명	구성비율
蟾蜍	Holotrichia	98.3
葛根	Puerariae Radix	42.1
天花粉	Trichosanthis Radix	17.6
肉桂	Bungarus Minimus	14.0
陳皮	Cinnamomi Cortex Spissus	14.0
白花蛇	Aurantii Nobilis Pericarpium	14.0
합계		200.0 g

2) 동물

일정한 온도와 습도가 유지되는 조건에서 사육된 체중 220 g 내외의 외관상 건강한 雄性 Sprague Dawley계 흰쥐를 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Cytochrome C, EDTA sodium salt, hippuryl-histidyl-L-leucine, hippuric acid, NADPH, NADP, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), NADH, N-1-methylnicotinamide (NMN), trichloroacetic acid, o-dianisidine, hematoxyline, trisma base, glutathione (reduced and oxidized form), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hypoxanthine, salicylate sodium, serum albumin bovine, thiobarbituric acid, sodium dodecyl sulfate, dithiothreitol, DL-3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA, hexadecyltrimethyl ammonium bromide, triethanolamine, 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), xanthine sodium salt, xanthine oxidase 등의 시약은 Sigma사로부터 구입하였으며 조제된 kit 시약은 모두 Eiken사로부터 구입하여 사용하였고 기

타 본 실험을 수행하는 중에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 일급 내지는 특급품을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

珍糖元 200 g을 물로 깨끗하게 세척하여 염분을 제거하고 바람이 잘 통하는 곳에서 음건한 다음 잘게 분쇄하였다. 여기에 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 30.6 g (수율 15.3%)을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 당뇨병 유도 및 검액 투여

실험동물을 정상군, 당뇨병을 유도한 대조군, 당뇨병 유발 후 珍糖元을 투여한 실험군 등 3군으로 나누었으며, 각 군에 6마리씩 배정하였다. 대조군과 실험군은 Citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 streptozotocin 용액 60 mg/kg을 복강내로 주사하였다. 실험군에는 珍糖元 추출물을 실험동물 체중 kg 당 50 mg씩 15일간 경구 투여하였고, 대조군에는 동량의 생리식염수를 투여하였다. 당뇨병 발생은 streptozotocin 투여 3일 후부터 urine strip으로 확인하였다. 실험동물은 도살 전 16시간 동안 물만 섭취케 하고 절식시켰다.

3) 효소원의 조제

실험동물을 ether를 사용하여 마취시킨 다음 복부

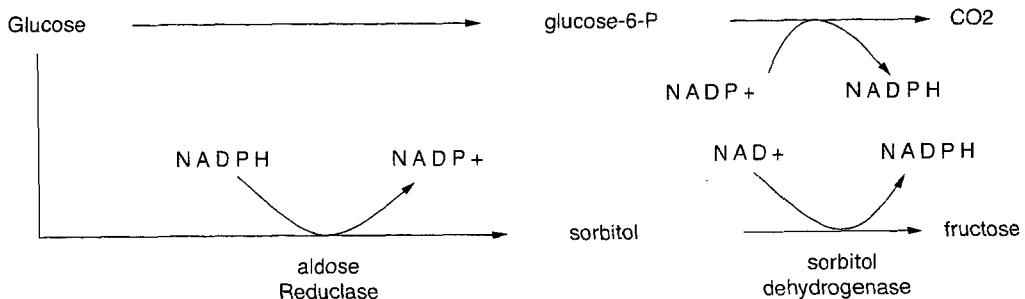
정중선을 따라 개방한 후 복부대동맥을 통해서 혈액을 채취하고 간 조직을 적출하였다. 적출한 간 조직을 생리식염수에 씻은 다음 이물질 또는 생리식염수를 제거하였다. 간 조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로 약함)를 가하여 빙냉 하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 과산화지질 및 glutathione 함량 측정원으로 사용하였다. 한편 마쇄 균질액을 다시 10,000 × G에서 20분간 원심분리하여 상정액을 얻어 xanthine oxidase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 실온에서 약 1시간 정도 방치시켜 혈청을 분리시키고 이 혈청을 glucose 함량 측정 시료로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4℃에서 행하였다 (Scheme 1).

4) 효소 활성 측정

① Aldose reductase 활성 측정

Aldose reductase 활성 측정은 Yamaoka 등의 방법²²을 약간 변경하여 일정량의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 용액에 2 mM NADPH와 200 mM DL-glyceraldehyde 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 DL-glyceraldehyde를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성도를 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

Scheme. 1. Polyol pathway



② Sorbitol dehydrogenase 활성 측정

Sorbitol dehydrogenase 활성 측정은 Hollmann 등의 방법²³⁾에 준하여 일정량의 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.6) 용액에 기질인 105 mM D-fructose, 0.2 mM NADH 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 D-fructose를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

③ Xanthine oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase (type O) 활성 측정은 Stirpe 등의 방법²⁴⁾에 준해 0.1 M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60 μM 및 효소원을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase (type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD⁺ 100 mM을 첨가해 동일

하게 반응시킨 다음 측정하여 나온 활성도 (total type : type D+O) 에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine 산화 효소의 형 전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine 산화 효소 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 형 전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

④ Glutathione peroxidase 활성 측정

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Paglia 등의 방법²⁵⁾에 준해 일정량의 0.1M Tris · HCl buffer (pH 7.2) 용액에 기질인 H₂O₂, 1 mM glutathione, glutathione reductase (2 I.U.), 0.2 mM NADPH 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 생성되는 GSSG를 환원시키는데 소비된 NADPH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 나타내었다.

⑤ Glutathione reductase 활성 측정

Glutathione reductase 활성 측정은 Meiz와 Langdon 등의 방법²⁶⁾에 준하여 27 mM EDTA와 16.3 mM GSSG가 함유된 0.1 M Tris HCl buffer (pH 8.0) 용액 일정량에 6 mM NADPH를 기질로 하여 효소액을 가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 GSH를 생성시키는데 소비된 NADPH의 함량을 파장 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 나타내었다.

5) 혈중 glucose 함량 측정

혈액 중의 glucose 함량 측정은 Thomason 등의 방법²⁷⁾에 따라 조제된 kit 시약을 이용하여 실시하였다. 혈청 일정량에 발색 시액 3.0 ml를 가한 다음 잘 혼합한 후 37℃에서 일정시간 반응시켰다. 이 반응액을 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 준하여 함량을 측정하였다.

6) 과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법²⁸⁾에 준해 간조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95℃에서 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. 과산화지질의 함량은 단백 1 mg당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

7) Glutathione 함량 측정

간 조직 중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법²⁹⁾에 준해 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상침액 일정량에 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하여 함량을 산정하였다. GSH 함량은 단백질 1 mg당 함유되어 있는 GSH의 양을 nmole로 나타내었다.

8) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법³⁰⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다.

9) 통계 처리

실험 성적의 유의성 검증은 student t-test를 행하였으며, p-value가 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

III. 實驗 成績

1. 체중에 미치는 영향

정상군의 체중이 247.3 ± 11.6 g이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군은 162.5 ± 10.4 g으로서 정상군에 비해 약 35% 정도 현저하게 감소되었다. 그러나 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 198.6 ± 10.7 g으로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 1).

2. glucose 함량에 미치는 영향

정상군의 혈중 glucose 함량이 98.4 ± 10.3 mg/dl인데 비하여 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군은 325.4 ± 22.9 mg/dl로 정상군에 비해 현저하게 증가되었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 175.3 ± 16.5 mg/dl으로서 대조군에 비해 현저하게 감소되었다 (Fig. 2).

3. 과산화지질 함량에 미치는 영향

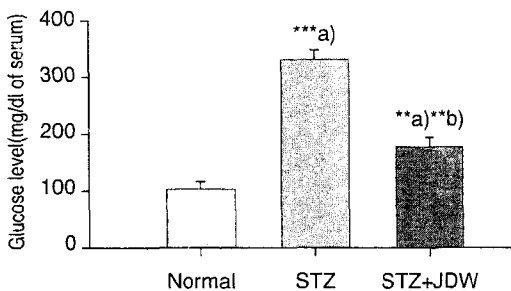


Fig. 2. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (**:p<0.01, ***:p<0.001). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

정상군에서 간조직 중의 과산화지질의 함량이 2.84 ± 0.16 nmoles이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군은 3.74 ± 0.19 nmoles로 현저하게 증가되었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 3.29 ± 0.19 nmoles로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 3).

4. Xanthine oxidase 활성 및 형 전환에 미치는 영향
정상군의 간조직 중의 xanthine oxidase 활성은 type O (oxidase)의 경우 0.17 ± 0.01 nmoles이었다. 그러나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군에서는 0.26 ± 0.02 nmoles로서 정상군에 비해 유의성 있게

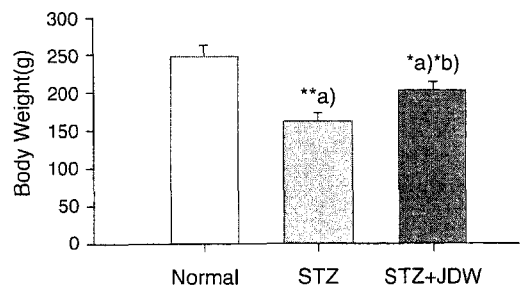


Fig. 1. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the body weight in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05, **:p<0.01). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

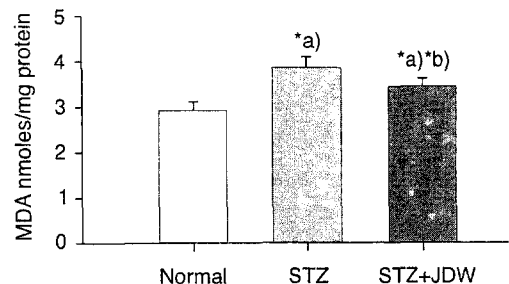


Fig. 3. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic lipid peroxide level in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

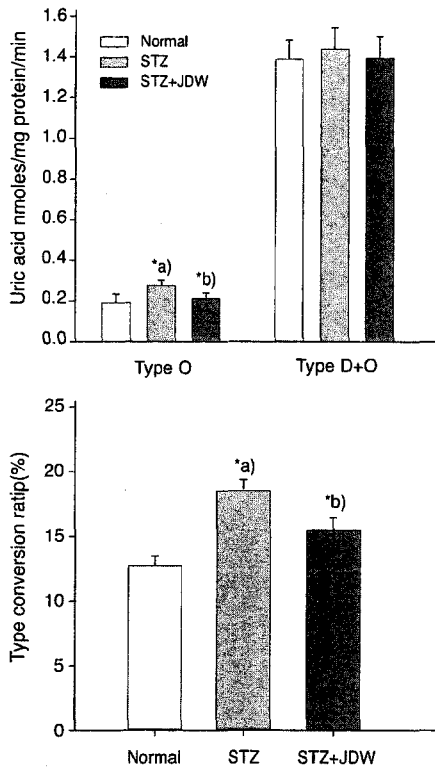


Fig. 4. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic xanthine oxidase activity and type conversion rate in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

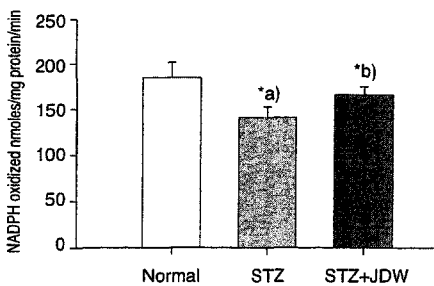


Fig. 6. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic glutathione peroxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

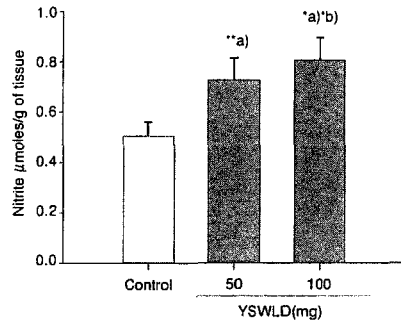


Fig. 5. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic glutathione level in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05, **:p<0.01). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

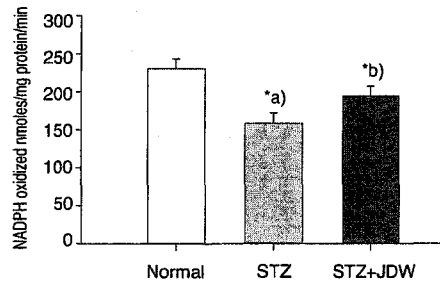


Fig. 7. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic glutathione reductase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

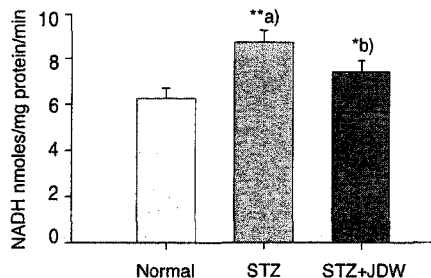


Fig. 8. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic aldose reductase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin-induced diabetic animals (*:p<0.05, **:p<0.01). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

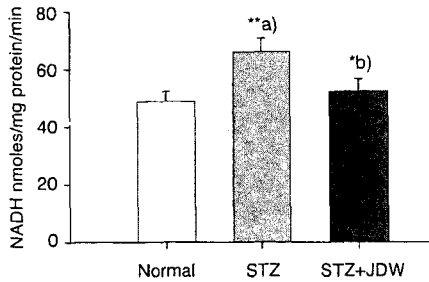


Fig. 9. Effects of the methanol extract of *Jindangwon* (JDW) on the hepatic sorbitol dehydrogenase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Values are means \pm SE for 6 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (*:p<0.05, **:p<0.01). STZ : Streptozotocin-treated group, JDW : *Jindangwon* extract-treated group.

게 증가되었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 0.21 ± 0.02 nmoles로서 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다. Type D+O (dehydrogenase-oxidase)의 경우는 정상군, 대조군, 실험군에서 활성의 변화를 관찰할 수 없었다.

Xanthine oxidase 형 전환비는 정상군에서 $12.4 \pm 0.9\%$ 인데 비하여 대조군에서 $18.3 \pm 1.2\%$ 로 약 45% 이상의 현저한 형 전환 증가를 확인할 수 있었다. 반면에 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 $15.2 \pm 0.9\%$ 로 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 4).

5. glutathione 함량에 미치는 영향

정상군에서 간조직 중의 glutathione 함량이 8.12 ± 0.46 nmoles이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군에서는 5.74 ± 0.38 nmoles로 유의성 있게 감소되었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 6.72 ± 0.41 nmoles로 대조군에 비하여 현저하게 증가되었다 (Fig. 5).

6. glutathione peroxidase 활성에 미치는 영향

정상군에서 간조직 중의 glutathione peroxidase 활성이 185.3 ± 15.4 nmoles인데 비해 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군에서는 139.2 ± 11.8 nmoles로서 약 25% 정도 유의성 있게 억제되었다. 반

면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 167.8 ± 12.3 nmoles로 대조군에 비해 약 20% 이상 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 6).

7. glutathione reductase 활성에 미치는 영향

정상군의 간장중 glutathione reductase 활성이 229.5 ± 15.8 nmoles이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군에서는 158.4 ± 13.2 nmoles로 정상군에 비하여 약 30% 이상 현저한 활성 억제 현상을 관찰할 수가 있었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 191.6 ± 15.2 nmoles로 대조군에 비해 약 20% 이상 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 7).

8. Aldose reductase 활성에 미치는 영향

정상군에서 간조직 중의 aldose reductase 활성은 6.22 ± 0.46 nmoles이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군에서는 8.69 ± 0.55 nmoles로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가되었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 7.27 ± 0.52 nmoles로 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 8).

9. Sorbitol dehydrogenase 활성에 미치는 영향

정상군에서 간조직 중의 sorbitol dehydrogenase 활성이 49.6 ± 3.72 nmoles이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군에서는 66.9 ± 4.88 nmoles로 정상군에 비하여 약 35% 정도 현저하게 증가되었다. 반면 streptozotocin 주입 후 珍糖元추출물을 투여한 실험군에서는 53.4 ± 4.15 nmoles로 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 9).

IV. 考 察

消渴의 病因에 관하여 血證論에 “血瘀在裏則口渴 所以然者 血與氣本不相離 內有瘀血 故氣不得通 不能載水津上升 是以發渴 名曰血渴 瘀血去則不渴矣” 라고 하였다. 또한 消渴이 오래 되어 陰陽이 모두 虛損

되던 津液이 耗傷되어 正氣가 더욱 虛弱해지고 따라서 推動이 無力해져 血行이 遲滯되고 瘀血을 이루게 되는데 이것이 당뇨병의 혈관 및 신경 합병증을 유발하게 된다^{19,20}. 따라서 血瘀는 消渴과 그 傳變證의 주요한 病因의 하나이다⁹.

珍糖元은 실험 연구에 의하면 당 대사와 당 운반 및 인산화에 관여하는 glucokinase와 hexokinase 활성을 증가시켜 당뇨병 치료에 효과를 나타내는 것으로 보고하였다⁸. 특히 주된 구성 약물인 蟾蜍는 풍뎅이의 幼蟲인 굼벵이를 乾燥한 것으로서 瘀血의 治療에 주로 활용되고 있으며 강한 血栓 溶解 活性을 가지고 있다^{21,32}. 그러므로 당뇨병 합병증의 치료에 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

정상적인 체내 대사 과정이나 외부에서 섭취되어진 xenobiotics의 대사 과정에서 생성되는 oxygen free radical은 순환기계 질환이나 당뇨병, 동맥경화 같은 대사성 질환을 유발시키는 중요한 인자 중의 하나로 알려져 있으며 또한 당뇨병과 그 합병증의 유발에 밀접한 관련이 있다는 많은 연구 보고가 있다⁹. 따라서 저자는 珍糖元이 oxygen free radical과 관련하여 당뇨병 합병증의 예방과 치료에 효과를 나타내는 지를 검토하고자 하였다.

일반적으로 당뇨병이 유발된 상태에서는 비효소적 당단백화, 당단류의 자가산화, 대사성 스트레스, sorbitol 경로 활성도의 변화, 항산화 방어 기전의 약화 등이 생기며 이때 나타나는 병태생리적 반응이 oxygen free radical의 증가와 관련된다고 알려져 있다^{33,35}.

본 실험에서는 珍糖元의 항당뇨 효과를 검토하는 하나의 방법으로 oxygen free radical의 생성과 소거에 관여하는 효소들의 반응 양상과 당뇨병의 합병증에 증대한 영향을 미치는 당의 비정상적 대사 경로 (polyol pathway)의 지표가 되는 두 효소인 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase의 활성^{36,37} 변화를 검토하였다. Streptozotocin을 주입하면 췌장의 베타세포가 파괴되어 insulin의 생성과 분비 기능이 억제되고 혈당이 상승하는 현상을 이용하여 당뇨병 모델동물을 만들었다.

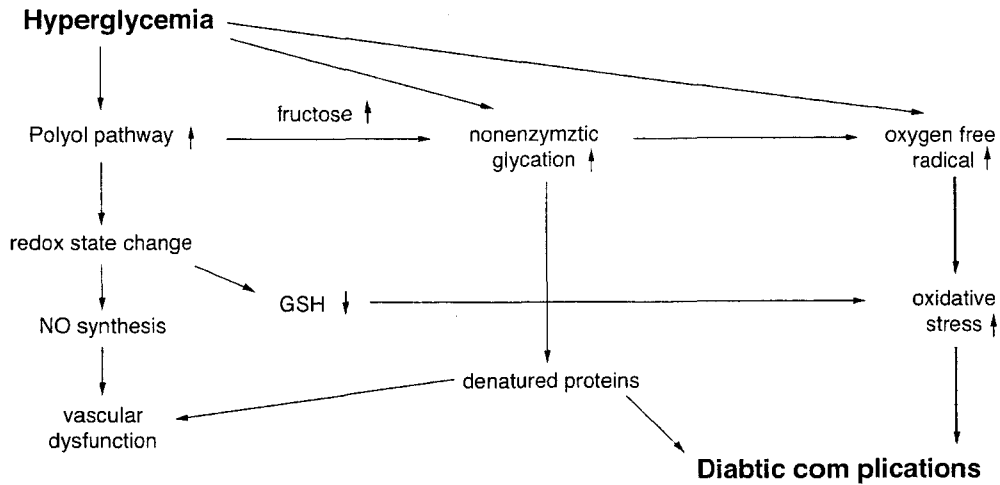
Streptozotocin 주입에 의해 현저하게 감소하던 실험

동물의 체중이 珍糖元추출물의 투여로 정상 수준으로 회복되는 양상을 확인할 수 있었다. 혈당 변화에서도 당뇨병 모델에서 유의성 있게 증가하던 혈중 glucose의 함량이 珍糖元추출물의 투여로 정상 수준으로 회복되는 경향을 보였다. 또한 streptozotocin에 의한 고혈당 상태에서 간조직 중의 xanthine oxidase 활성과 과산화지질의 생성이 현저하게 증가하였으나 珍糖元추출물의 투여로 인해서 정상 수준으로 억제되는 것으로 나타났다.

Xanthine oxidase는 기질을 산화시킬 때 기질의 전자를 분자상태의 산소가 수용하게 되는 생화학적 반응을 촉매하여 활성산소의 생성을 증가시켜 streptozotocin-induced oxidative stress를 유발하는데 관여하고 있다³⁸. 珍糖元추출물은 이 효소의 활성을 억제시킴으로서 oxygen free radical의 생성을 저하시켜 이로 인한 조직 손상을 감소시킴으로서 과산화지질의 생성이 억제되었을 것으로 생각되어지며 이러한 실험성적으로 인해 당뇨병의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 사료되어진다.

Glutathione은 여러 가지 생화학적 반응에 필수적인 물질이며 oxygen free radical의 소거에 관여하고 있다³⁹. Streptozotocin 주입에 의해 현저하게 감소하던 간조직 중의 glutathione의 함량이 珍糖元추출물 투여에 의해 정상 수준으로 회복되어짐을 알 수 있었으며 glutathione 함량 감소 효과와 xanthine oxidase 활성 증가 현상이 서로 밀접한 관계를 갖고 있음을 감안해 보면 이러한 실험 성적은 매우 흥미 있는 결과라고 생각되어진다.

한편 glutathione을 매개로 하는 glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성도 당뇨병 모델 동물에서 유의성 있게 억제되었으나 珍糖元추출물의 투여로 인해서 정상 수준 가깝게 회복됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 성적으로 보아 고혈당 상태에서 glycation 현상이 진행되는 과정에서는 활성산소류들의 생성이 증가될 뿐만 아니라 활성산소 소거 효과가 약화되어 생체세포가 손상을 받는 악순환이 이어질 것으로 생각되어지며 珍糖元추출물이 생체 방어 기구에 크게 관여하고 있는 glutathione의 활용을 증



Scheme. 2. Putative factors involved in the pathogenesis of diabetic complications

진시키고 있음을 나타내고 있다.

일반적으로 고혈당 상태가 체내에서 지속되면 당뇨병의 복잡한 합병증과 밀접한 관련이 있는 비정상적인 당 대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 야기시키는데 이 polyol pathway는 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase에 의해서 반응이 이루어지게 된다 (Scheme 2)^{36,37}. 당뇨병 모델 동물에서는 두 효소 모두 활성이 현저하게 증가하였으나 珍糖元추출물의 투여로 인해 정상 수준 가깝게 조절되고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 珍糖元추출물이 두 효소의 활성을 억제하여 polyol pathway의 비정상적인 작동을 정상적으로 조절해 줌으로써 oxidative stress로 인한 체장 조직의 손상을 억제시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다.

이상의 모든 실험 결과들을 종합하여 볼 때 珍糖元추출물은 체내에서 oxygen free radical의 생성계와 소거계에 관여하는 효소들의 활성을 조절하여 oxidative stress를 감소시킬 수 있을 것으로 생각되며 이는 체장의 β-cell에도 영향을 미쳐 조직 손상을 억제시켜 당뇨병의 발현을 억제시킬 것으로 사료되어진다. 또한 해독기구를 활성화시켜 활성산소에 의한 조직 손상을 경감시켜 줄 수 있을 뿐만 아니라 oxidative stress로 인해서 나타날 수 있는 수많은 난치

성 질환의 예방에도 효과가 있을 것으로 생각되어진다. (Scheme 2)

V. 結 論

珍糖元이 oxidative stress와 관련하여 당뇨병의 예방과 치료에 효과를 나타내는 지를 검토하였다. Streptozotocin 주입에 의해 흰쥐의 체중이 현저하게 감소되고 혈중 glucose 함량이 현저하게 증가하였으나 珍糖元추출물의 투여로 유의성 있게 회복되었다. 과산화지질의 함량, xanthine oxidase 활성 및 형 전환 비가 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 증가되었으나 珍糖元추출물의 투여로 유의성 있게 감소되었다. Streptozotocin 주입에 의해 현저하게 억제되던 glutathione 함량과 glutathione peroxidase 및 glutathione reductase 활성이 珍糖元추출물의 투여로 정상 수준으로 회복되었다. Aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성이 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 증가되었으나 珍糖元추출물의 투여로 유의성 있게 억제되었다. 이상의 실험 결과는 珍糖元이 체내에서 oxygen free radical의 생성계와 소거계에 관여하는 효소들의 활성을 조절하여 oxidative stress를 감소시킬 수 있을 것으로 생각되며 이는 체장의 β-cell에

도 영향을 미쳐 조직 손상을 억제시켜 당뇨병의 발현을 억제시킬 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Bowman WC, Rand MJ. Endocrine functions of the pancreas. In textbook of pharmacology. 2nd ed. London:Blackwell Scientific publications;1980, p.19,43-19,64.
2. Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 1985;34:145-60.
3. 김웅진 외. 당뇨병학. 서울: 고려의학;1992, p.391-468.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine, 2nd ed. Oxford:UK. Oxford Univ. Press;1989.
5. Godin GV, Wohaieb SA. Reactive oxygen radical processes in diabetes, In Oxygen Radicals in the Pathophysiology of Heart Disease, Singa PK, ed. Boston:MA, Kluwer;1988.
6. Oberly LW. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biol Med.* 1988;5: 113-24.
7. Wolff SP. The potential role of oxidative stress in diabetes and its complications : Novel implication for theory and therapy in diabetic complications, Scientific and Clinical Aspects, Crabbe MJC, ed. NY: ChurchilLivingstone. 1987:167-220.
8. Pryor WA. Free radicals in biology in "Involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis in medical chemistry" Elsevier, Amsterdam. 1977:331-61.
9. Helgason T, Jonasson MR. Evidence for a food additive as a course of ketosis-prone diabetes. *Lancet.* 1981;2:716-20.
10. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社; 1986, p.477.
11. 柴瑞燾. 消渴. 山西中醫. 1993;(1):56.
12. 余永譜. 中醫治療內分泌代謝疾病. 浙江: 浙江科學技術出版社; 1992, p.239,243.
13. 김영기, 임중국. 당뇨병의 실험 문헌적 고찰. 동국한의약연구소논문집. 1999;7(2):27-46.
14. 윤철호, 신현철, 정지천. IL-1 β 처리 당뇨병 마우스의 췌장 glucokinase 및 hexokinase 활성에 대한 枇杷葉의 영향. 대한한방내과학회지 1998;19(1): 466-76.
15. 王作成. 中醫中藥對糖尿病自由基代謝的影響. 天津中醫 1995;12(5):43-4.
16. 오승환. 당뇨병 치료례. 대한한의학회지. 1987;8(2):24-8.

17. 강선희. 無如丸이 streptozotocin으로 유도된 당뇨병 원쥐에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 석사 학위논문. 1995.
18. 김세운, 윤철호, 정지천, 김철호. Effect of *Jindangwon* on streptozotocin-induced diabetes. *Life Science* 2000;67:1251-63.
19. 張德蘊 主編. 糖尿病綜合治療與康復. 北京:中國中醫藥出版社;1996, p.15,114-5.
20. 林 蘭 主編. 糖尿病的中西醫結合論治. 北京:北京科學技術出版社;1992, p.31-2.
21. 홍시내, 정지천, 김철호. 蟾蜍의 혈전 용해 효소 분리 및 그 특성에 관한 연구. 대한한방내과학회지 1999;20(1):198-209.
22. Yamaoka T, Nishimura C, Yamashita K, Itakura M, Yamada T, Fujimoto J, Kokai Y. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia.* 1995;38:255-61.
23. Hollmann S. In Hoppe-Seyler Thiefelder : Handbuch der physiol. und path.-chem. Analyse, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, Vol. VIa. 1964:704.
24. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase: to Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) oxidase (type O). *J Biol Chem.* 1969;244:3855-63.
25. Paglia ED, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70:158-69.
26. Meiz CE, Langdon RG. Hepatic glutathione reductase : I. Purification and general kinetic properties. *J Biol Chem.* 1962;237:1589.
27. Thomson RH. Colorimetric glucose oxidase method for blood glucose. *Clin Chem Acta.* 1966;13:133-5.
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
29. Ellmann GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70-7.
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
31. 唐容川. 血證論. 上海:上海人民出版社;1977, p.87.
32. 文成煥, 高炳熙, 宋一炳. 血栓症에 미치는 蟾蜍의 效能에 關한 實驗의 研究. 慶熙醫學. 1992;8(2):177-81.

33. Granger DN, Parks DA. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. *The Physiologist*. 1983;26:159-64.
34. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med*. 1989;320:915-24.
35. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Masuoka S, Ohishi N, Yaki K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med*. 1979;21:104-7.
36. Pugliese G, Tilton GT, Williamson JR. Glucose-induced metabolic imbalance in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev*. 1991;7:35-59.
37. Stevens MJ, Dananberg J, Feldman EL, Lattimer SA, Kamijo M, Thomas TP, Shindo H, Sima AA, Greene DA. The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and Na-K-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. *J Clin Invest*. 1994; 94:853-9.
38. Battelli MG, Lorenzoni E, Stirpe F. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase) : Purification, interconversion and some properties. *Biochem J*. 1973;131:191-8.
39. Chasseud LF. Distribution of enzymes that catalyze reactions of glutathione with α,β -unsaturated compounds. *Biochem J*. 1973;131:756-69.