

생지황(*Rhemanniae Radix*)이 Streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향

김 정 상

동신대학교 한의과대학

Effect of *Rhemanniae Radix* on the Hyperglycemic Mice Induced with Streptozotocin

Jeong-Sang Kim

College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

Abstract

This study has been carried out to investigate the effect of the administration of *Rhemanniae Radix* extract (5.0 mL/kg/day, RR group) on the hyperglycemic mice (HM group) induced with streptozotocin (STZ). In blood glucose level, RR group showed a significant decrease compared with HM group. The result of glucose tolerance test was more favorable in RR than HM group. A lot of insulin-positive cells and insulin-like growth factor- II positive materials were observed in RR group. A number of apoptotic particles were observed in the HM group, but several apoptotic nuclei were found in RR group. Pancreatic islets of HM group were destructed by the administration of STZ, but islets were recovered from damage in the RR group. These results suggest that administration of *Rhemanniae Radix* extract to the hyperglycemic mice prevent from the damage induced by STZ.

Key words: *Rhemanniae Radix*, hyperglycemic mice, insulin-positive cells, insulin-like growth factor- II , apoptosis

서 론

인슐린 의존성 당뇨병(제1형 당뇨병)과 인슐린 비의존성 당뇨병(제2형 당뇨병) 모두 췌장의 기능적인 β -세포 용적이 부적절한 결과이다(1). Swenne(2)은 노화된 흰쥐에서 인슐린을 생산하는 β -세포의 재생능력을 규명하기 위하여 흰쥐의 췌장섬(pancreatic islet) β -세포를 조직 배양한 결과 주령이 높아질수록 유사분열 능력은 감소하였으나, β -세포들은 지속적으로 세포분열을 유지하였다. 제1형 당뇨병인 생쥐의 췌장에서 관상피세포를 분리하여 배양한 Ramiya(3)의 연구에서 관상피세포가 췌장섬의 줄기 세포로 분화하여 α -세포, β -세포, δ -세포로 성장하고 분화한 결과를 나타내었다. 혈중 포도당 농도가 높게 유지되면 췌장섬의 β -세포 복제가 촉진된다고 하며(4), 흰쥐의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 췌장관 내피가 췌장섬으로 분화·성장을 유도한다는 보고도 있다(5). 특히, insulin-like growth factor(IGF)는 인슐린과 유사한 대사효과를 갖고 있으면서 세포의 증식과 분화를 자극하며(6,7), β -세포의 성장, 생존 및 대사를 조절하여 제1형 당뇨병으로부터 보호작용을 하여 인슐린염이나 β -세포의 파괴를 방어한다고 한다(8). 생

지황(*Rhemanniae Radix*)은 玄蓼科에 속한 다년생 초본인 지황(*Rhemannia glutinosa* Libosch.)의 신선한 뿌리로써 한의학에서는 淸熱涼血 藥類로 분류된다. 성질과 맛은 달고 쓰며, 차고 독이 없으며 歸經은 心肝腎의 3經이다. 성질이 차가운 약물이라 열을 내리고 혈액을 식히며 진액을 생성하여 갈증을 멈추게 하는 작용이 있어 消渴의 치료에 사용한다고 하였다(9). 최근 지황에 관한 연구에서 Zhang 등(10)은 지황에서 추출한 다당류가 alloxan으로 유발된 당뇨쥐의 혈당을 낮추어 주었을 뿐만 아니라 간에서 글리코겐의 저장을 증가시키고 glucose-6-phosphatase의 활성을 촉진시켜 준다고 하였다. 이에 저자는 생지황의 당뇨병 치료효능을 규명하기 위하여, streptozotocin(STZ)을 投與하여 췌장섬을 파괴시킨 생쥐에 생지황 煎湯液을 6주간 투여한 후 혈당의 변화와 당내성 검사 및 면역조직화학 검사를 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 고혈당 유발

체중 25 ± 1 g의 8주령 웅성 생쥐(ICR strain)를 (주)다물사이언스로부터 구입하여 동물사육실에서 1주 이상 적응시

킨 후 사용하였다. 당뇨 유발은 12시간 동안 절식시킨 다음 각각의 생쥐에 STZ 50 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 복강 투여한 다음 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 1회 복강 투여하여 고혈당 생쥐를 유발하였다. 공복 시 정상 생쥐의 혈당은 약 70 mg/dL이었으며, 유발 후 약 113 mg/dL인 것을 실험군으로 사용하였다.

약물 추출 및 실험군 분류

생지황 전탕액은 생지황 27.3 g을 증류수 400 mL에 넣고 4시간 동안 약탕기로 끓인 다음 최종 200 mL 농축하였으며, 고혈당이 유발된 생쥐에 증류수(5.0 mL/kg/day)를 투여한 대조군(HM군)과 생지황 전탕액(5.0 mL/kg/day)을 투여한 실험군(RR군)으로 구분하여 6주간 매일 구강 투여하였다.

혈당측정

혈당측정은 매주 1회 6주 동안 실시하였으며, 측정 12시간 전에 금식을 시킨 다음 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 측정하였다.

당내성 검사

6주째(42일)의 HM군과 RR군을 대상으로 실시하였다. 당내성 검사를 시행하기 전에 12시간 동안 절식시킨 다음 glucose (1.0 g/kg body weight)를 복강주사하였다. 그 이후 30, 60, 90, 120분에 각각 꼬리 정맥을 통하여 혈액을 채취한 다음 혈당을 측정하였다.

면역조직화학 염색

생쥐의 췌장 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5 µm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 xylene으로 paraffin을 제거한 다음 ethanol 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 흡수과정을 거치게 하였다. 12시간 후 0.1 M의 phosphate buffer saline(PBS, 0.9% NaCl, pH 7.2) 용액에 하룻밤 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 insulin(Novo castra), insulin-like growth factor-II (IGF-II, H-103, Santa Curz Biotechnology)를 각각 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS 용액으로 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) reagent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS 용액에서 15분간 세척하였다.

3,3'-diaminobenzidine(DAB, Sigma) 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을

제작하여 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진 촬영을 하였다.

Apoptosis 관찰

췌장섬의 세포사멸 핵을 밝히기 위하여 Apoptag *in situ* apoptosis detection kit(Intergen®)를 이용하여 수행하였다. 조직 절편을 slide glass에 부착시킨 다음 xylene으로 파라핀을 제거한 다음 농도가 낮은 순으로(100%, 90%, 70%)으로 흡수 과정을 거친 다음 5분 동안 PBS에서 배양하였다. 염색을 위한 전처리 방법은 다음과 같다. Proteinase K(20 µg/mL; Sigma)를 첨가하여 15분 동안 배양한 후, 증류수로 세척하고, 3% H₂O₂(vol/vol, in PBS)에서 5분 동안 배양하여 endogenous peroxidase의 활성을 억제하였다. Equilibration 완충액을 30초 동안 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) enzyme를 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. Stop 완충액을 처리한 다음 slide glass을 수세하였다. DAB 발색시약을 5분 동안 처리한 다음 methyl green으로 대조 염색한 다음 탈수과정을 거친 후 coverslips을 봉합하였다. 이후 동일한 방법으로 사진을 촬영하였다.

췌장섬의 계수

인슐린 면역조직화학 염색을 시행한 HM군과 RR군 조직의 절편 30개를 계수하였다. 췌장섬의 크기는 고려하지 않았다.

통계처리

실험 결과에 대한 통계처리는 SAS(statistical analysis system) program에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05와 0.01 이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

인슐린 의존성 당뇨병은 자가면역질환으로 인슐린을 분비하는 췌장의 내분비샘인 췌장섬의 β-세포를 선택적으로 파괴한다고 한다(8). 본 연구에서는 실험동물의 고혈당을 서서히 유발하기 위하여 생쥐에 저용량의 STZ 50 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 투여하여 1차 유발한 다음, 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 복강 투여하여 당뇨병을 유발하였다. 한의학에서 생지황은 淸熱涼血生津止渴 효능이 있어 大熱煩渴 등의 병증을 치료한다고 하였으며(9), 열을 내리고 혈을 식히며 진액을 생성하는 효능이 있어 溫病에 의한 傷陰, 大熱에 의한 煩渴이나 消渴 등의 치료에 사용하는 약물(11)로 알려져 있다. 생지황 전탕액의 투여가 췌장섬이 파괴되어 고혈당이 유발된 생쥐의 혈당량과 당내성 능력의 개선 및 췌장섬의 재생에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

혈당량의 변화

STZ로 유발된 당뇨 생쥐의 혈당량은 유발 후 증가하는 경

향을 보였다(12,13). 본 연구에서는 STZ를 투여한 다음 생쥐의 혈당량이 약 113 mg/dL인 것을 HM군과 RR군으로 구분하였다. STZ로 고혈당을 유발한 HM군 생쥐의 혈당은 유발 후 계속 증가하다가 5주째에 가장 높게 나타났다. 그러나 생지황 전탕액을 투여한 RR군에서는 혈당량의 증가 속도가 HM군에 비하여 미약하였으며, 2주부터는 전반적으로 유의성있게 낮았다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 Zhang 등(10)이 지황에서 추출한 다당류를 alloxan을 투여하여 유발된 고혈당 생쥐에 투여한 결과와 유사하였다.

당내성 검사

STZ 투여하여 췌장섬의 β-세포에 손상을 유발한 다음 생지황을 6주 동안 구강 투여한 후 β-세포의 기능을 검증하기 위하여 당내성 검사를 시행하였다. 포도당(1.0 g/kg body weight)을 투여한 결과 HM군에서는 30분 후에 가장 높은 혈당치를 보여 주었으며 120분에서도 비교적 높은 혈당을 유지하였다. 생지황을 6주간 투여한 RR군은 투여후 30분에 가장 높은 혈당을 유지하였으나 그 이후 급격히 감소하여 120분 후에는 HM군에 비하여 낮은 혈당량을 보였다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 HM군에 비하여 RR군의 β-세포가 STZ에 의한 손상으로부터 보다 더 회복되었음을 의미한다고 할 수 있을 것이다.

췌장섬의 insulin-면역조직화학

Mulder 등(14)은 생쥐에 alloxan을 투여한 결과 β-세포의 수가 현저히 감소하였으며 β-세포의 기능장애가 나타났다고 하였다. Reddy 등(15)은 STZ로 유발한 당뇨병생쥐의 큰포식 세포에서 분비되는 nitric oxide가 췌장섬의 β-세포를 파괴하는 주요 분자일 가능성이 있다고 하였다. 본 연구에서는 STZ

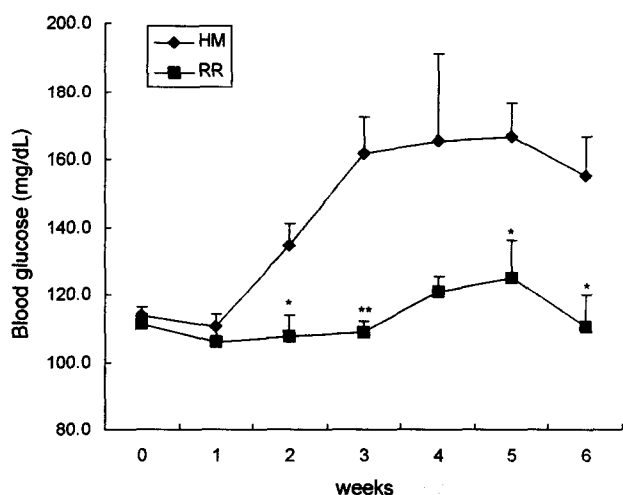


Fig. 1. Blood glucose concentrations (mg/dL) measured once a week from 1th to 6th week. Streptozotocin was administered on day 0. HM, control group administered with STZ; RR, experimental group feeding of *Rhemanniae Radix* (5.0 mL/kg/day) following administered with STZ. The results are shown as mean±SE. *p<0.05; **p<0.01 compared with HM group.

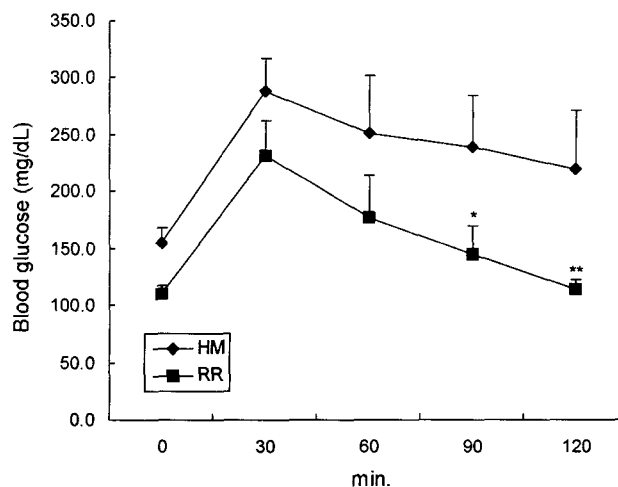


Fig. 2. Blood glucose tolerance test on 42nd day. Streptozotocin was administered on day 0. HM, control group administered with STZ; RR, experimental group feeding of *Rhemanniae Radix* (5.0 mL/kg/day) following administered with STZ. Results are shown as mean±SE. *p<0.05; **p<0.01 compared with HM group.

를 소량씩 3회 복강 투여하여 당뇨를 유발시킨 6주 후 HM군 생쥐의 췌장조직을 관찰한 결과, 췌장섬의 형태학적 구조는 매우 손상되어 있었으며 인슐린에 면역반응을 보이는 β-세포가 극히 소수 관찰되었으나 염색성 또한 미약하였다(Fig. 3A). 그러나, 생지황 전탕액을 6주 동안 구강 투여한 RR군의 췌장섬 세포들은 인슐린에 강한 면역반응성을 보여주었을 뿐만 아니라 HM군에 비하여 다수의 췌장섬들이 관찰되었다(Fig. 3B). 이와 같은 결과로 보아 생지황 전탕액의 유효성 분은 STZ로 손상된 췌장섬의 회복 또는 재생에 관여하였을 것으로 사료되었다.

췌장섬의 IGF-II의 면역조직화학

STZ를 투여하여 β-세포를 파괴시킨 후 IGF를 처리하면 β-세포의 복제가 촉진되며(16), 제2형 당뇨병에서 IGF의 발현은 β-세포의 회복에 관여하는 것으로 알려져 있다(16-18). Kim과 Na(19)는 배에서 추출한 phenolic compound가 STZ로 손상된 췌장섬의 재생에 관여하여 IGF-II의 발현을 촉진하였다고 하였다. 본 연구의 IGF-II의 면역조직화학 검색 결과 HM군에서는 IGF-II의 발현이 거의 없었으나(Fig. 4A), RR군에서는 미약하지만 IGF-II의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 이와 같은 결과에서 생지황이 췌장섬의 재생에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

췌장섬의 apoptosis

HM군과 RR군의 췌장섬에서 관찰되는 세포자멸을 규명하기 위하여 apoptosis detection kit를 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. HM군 췌장섬들은 대부분 파괴되어 구성 세포들이 성글게 관찰되었다. 췌장섬 전반에 걸쳐 apoptosis 면역 반응성을 보이는 파립들이 나타났다(Fig. 5A). 생지황 전탕액을 6주 동안 투여한 RR군에서 관찰되는 췌장

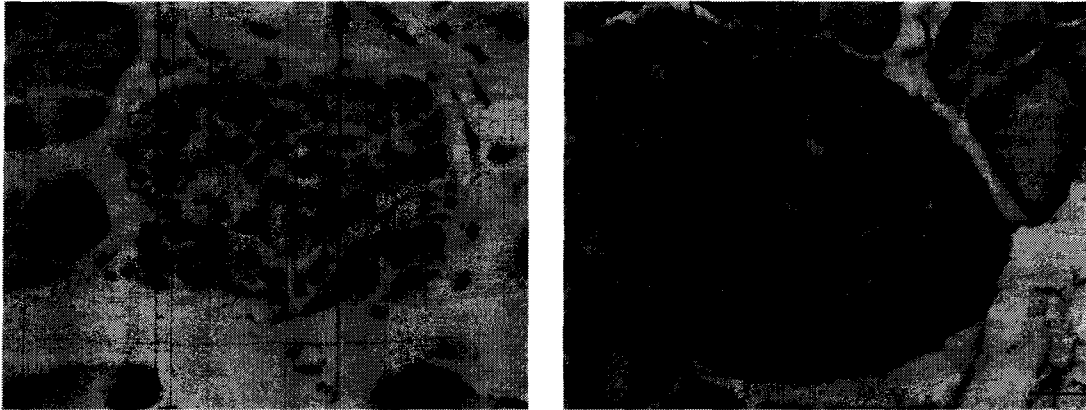


Fig. 3. Insulin-immunohistochemistry of pancreas from HM (A) and RR group (B).

A few of insulin-immunoreactive β -cells (arrows) were observed in the pancreatic islet from HM group. Stronger staining for insulin could be found in the pancreatic islet from RR group. This result demonstrated that most of the cells at the pancreatic islet are insulin-secreting β -cells. Insulin-Immunostain. Bar indicates 25 μ m.



Fig. 4. Immunohistochemistry to visualize immunoreactive IGF-II in sections of mouse pancreas from HM (A) and RR group (B). Immuno-positive materials for IGF-II were not observed in the HM group, but a few immuno-positive nucleus (arrows) for IGF-II were observed in the RR group. IGF-II Immunostain. Bar indicates 25 μ m.

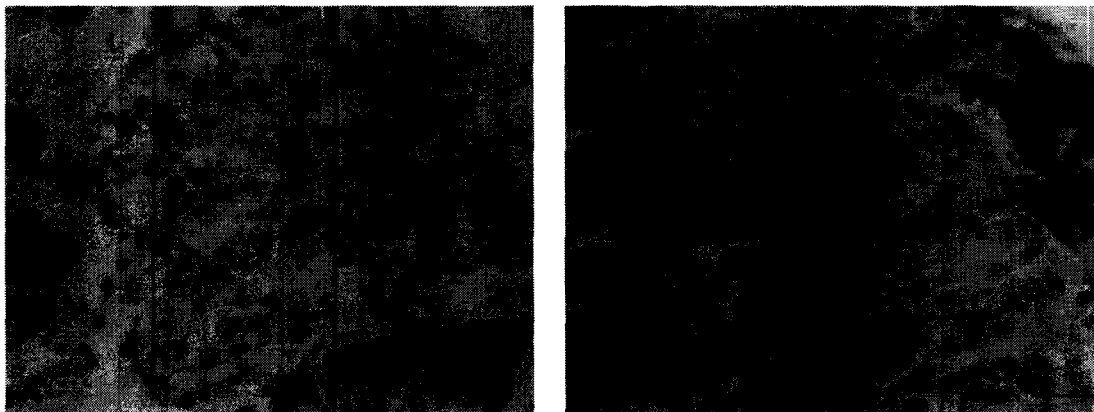


Fig. 5. Immunohistochemical localization of apoptosing cells using molecular histochemistry in pancreatic islet from HM (A) and RR group (B) at 6th week.

A lot of apoptotic particles were observed in HM group and several apoptotic nuclei (arrows) were observed in RR group. Apoptosis-Immunostain. Bar indicates 25 μ m.

섬들은 HM군에 비하여 정상적인 형태적 구조를 보여 주었으나 apoptosis에 면역 반응성을 보이는 세포들이 간혹 관찰

되었다(Fig. 5B). 이와 같은 결과는 인슐린 의존성 당뇨병은 자가 면역질환에 의하여 β -세포가 파괴되지만 췌장섬의 발

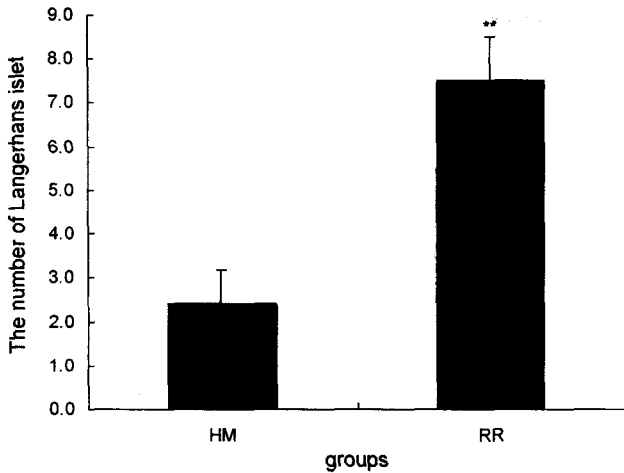


Fig. 6. The numbers of pancreatic islets from HM and RR group.

HM, control group administered with STZ; RR, experimental group feeding of *Rhemanniae Radix* (5.0 mL/kg/day) following administered with STZ. Results are shown as mean ± SE.

**p<0.01 compared with HM group.

생과정 중에도 먼저 분화된 β-세포가 세포자멸 되면서 더욱 많은 β-세포가 분화된다는(20)는 보고와 일치한 것으로 사료되었다.

췌장섬의 계수

각 HM군과 RR군 췌장을 절취하여 영구 시료를 제작한 후 췌장섬의 수를 각 조직 절편당 계수한 결과 STZ를 복강 투여하여 췌장섬의 β-세포를 파괴시킨 HM군에서는 췌장섬이 거의 관찰되지 않았으나 극소수 관찰되는 췌장섬은 크기가 매우 작았다. STZ를 투여한 후 6주 동안 생지황 전탕액을 투여한 RR군에서는 절편당 관찰되는 췌장섬의 수가 증가하였다(Fig. 6).

요 약

본 연구는 streptozotocin(STZ)을 투여하여 고혈당이 유발된 생쥐(HM군)에 생지황(*Rhemanniae Radix*) 전탕액의 투여(5.0 mL/kg/day, RR군) 효과를 밝히기 위하여 수행하였다. STZ로 유발된 생쥐에 생지황 전탕액을 6주 동안 구강 투여한 후 혈당과 당내성 검사 및 췌장섬의 면역조직화학 검사를 하였다. 혈당수준은 RR군이 HM군에 비하여 2, 3, 5, 6주에서 유의성있게 낮았으며, 당내성 검사 또한 RR군이 HM군에 비하여 우수한 결과를 보여 주었다. 6주 후 insulin-양성 β-세포들과 insulin-like growth factor-Ⅱ 양성 물질들은 HM군에 비하여 RR군에서는 보다 높게 나타났다. HM군에서는 apoptosis 면역반응성 과립들이 췌장섬 전반에 걸쳐 관찰되었으나, RR군에서는 일부 세포들의 핵에서 면역반응성을 보여주었다. HM군에서는 대부분 췌장섬들이 파괴되어 소수 관찰되었으나 RR군은 다수 관찰되었다. 이와 같은 결과로 보아 생지황 전탕액은 STZ로 유발된 손상으로부터 췌

장섬을 회복시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 동신대학교 2003학년도 학술연구지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Booner-Weir S. 2000. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302.
- Swenne I. 1983. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic β-cell of the rat. *Diabetes* 32: 14-19.
- Ramiya VK. 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6: 278-282.
- Hellerstrom C, Swenne I. 1991. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic β-cells. *Diabetes* 40: 89-93.
- Rooman I, Schuit F, Biuwens L. 1997. Effects of vascular endothelial growth factor on growth and differentiation of pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 76: 225-232.
- Le Roith D. 1997. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 336: 633-640.
- Hugl SR, White MF, Rhodes CJ. 1998. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic β-cell growth is glucose dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathway by glucose and IGF in INS-1 cells. *J Biol Chem* 273: 17771-17779.
- Chen W, Salojin KV, Mi QS, Grattan M, Meagher TC, Zucker P, Delovitch TL. 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-1/IGF-binding protein-3 complex: therapeutic efficacy and mechanism of protection against type 1 diabetes. *Endocrinology* 145: 627-638.
- 신민교. 1986. 임상본초학. 남산당, 서울. p 297-298.
- Zhang R, Zhou J, Jia Z, Zhang Y, Gu G. 2004. Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. *J Ethnopharmacol* 90: 39-43.
- 중약대사전. 1997. 정담, 서울. p 2345.
- Cheta D. 1998. Animal models of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11: 11-19.
- Maeda M, Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Taniguchi K, Nishinakagawa H. 2003. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. *Vet Pathol* 40: 187-195.
- Mulder H, Gebre-Medhin S, Betsholtz C, Sundler F, Ahren B. 2000. Islet amyloid polypeptide (amylin)-deficient mice develop a more severe form of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E684-691.
- Reddy S, Yip S, Karanam M, Poole CA, Ross JM. 1999. An immunohistochemical study of macrophage influx and the co-localization of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of non-obese diabetic (NOD) mice during disease acceleration with cyclophosphamide. *Histochem J* 31: 303-314.
- George M, Eduard A, Alba C, Cristina C, Jean CD, Bosh F. 2002. β-cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109: 1153-1163.
- Thraillkill K, Quattrin T, Baker L, Litton J, Dwigun K, Rearson M, Poppenheimer M, Kotlovker D, Giltinan D, Gesundheit N, Martha P Jr. 1997. Dual hormonal replacement therapy with insulin and recombinant human insulin-

- like growth factor (IGF)-I in insulin-dependent diabetes mellitus: effects on the growth hormone/IGF/IGF-binding protein system. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1181-1187.
18. Quattrin T, Thraillkill K, Baker L, Litton J, Dwigun K, Rearson M, Poppenheimer M, Giltinan D, Gesundheit N, Martha P Jr. 1997. Dual hormonal replacement with insulin and recombinant human insulin-like growth factor I in IDDM. Effects on glycemic control, IGF-I levels, and safety profile. *Diabetes Care* 20: 374-380.
19. Kim JS, Na CS. 2002. Effects of pear phenolic compound on the STZ-treated mice for induction of diabetes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1107-1111.
20. Petrik J, Arany E, McDonald J, Hill J. 1998. Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139: 2994-3004.

(2004년 4월 14일 접수; 2004년 6월 29일 채택)