

丹梔逍遙散加減方이 streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향

김진호, 김경수, 김정상

동신대학교 한의과대학

ABSTRACT

Effect of Danchisoyosangagambang Extract on the Hyperglycemic Mice Induced with Streptozotocin

Jin-Ho Kim, Kyung-Soo Kim, Jeong-Sang Kim

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

This study has been carried out to understand the effect of Danchisoyosangagambang (DC) on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin(STZ). Experimental groups were made diabetic mice by intraperitoneal injection of STZ(60 mg/kg of body weight) twice by 24 h interval and then 120 mg/kg STZ was injected again 3 days after the earlier treatment. Control group was administered mice with 0.9 % saline(2 mL/kg), and experimental groups were administered DC extract(DCA group, 10 mg/kg/day; DCB group, 30 mg /kg/day) after hyperglycemic induction for 6 weeks. The body weight of experimental groups was lower than control. The blood glucose concentration increased continuously, reaching to 298.9 mg/dL after 6 weeks, however, experimental groups of the DCA and DCB groups significantly($p<0.01$) decreased in the 4, 5, and 6 weeks groups. Blood glucose tolerance test was not significant between control and experimental groups. We examined the blood transaminase activities to know the effect of herbal medicine on liver function. T

교신저자 : 김정상

동신대학교 한의과대학 해부학교실

Tel : 061) 330-3512 E-Mail : jskim@dsu.ac.kr

접수 : 2005/ 10/ 3 수정 : 2005/ 10/ 10 채택 : 2005/ 10/ 20

he GOT activities were lower in group DCB than in control. The GPT activities were lower in group DCA and DCB than in control. The content of triglyceride was significantly increased in group DCA compared to control. The SOD and catalase activities were higher in the group DCA compared to control. The results of immunohistochemical study, a few of insulin positive cells observed in the control and experimental group. These results suggest that administration of DC extract to the hyperglycemic mice decreased the blood glucose level.

Key Word : Danchisoyosangagambang, blood glucose, SOD and catalase, immunohistochemical

I. 서 론

당뇨병은 최근 10년간 대부분의 산업국가에서 급증하여 주요한 공중 보건 문제로 대두되고 있다¹⁾. 당뇨병은 혀장의 β -세포에서 생산된 인슐린의 분비와 반응의 변화에 의해서 발생되는 대사질환으로 당대사²⁾, 비민³⁾, 지질대사⁴⁾ 이상으로 초래된 증성지방의 이상축적이나 고지혈증 등이 원인으로 동맥경화, 관상동맥질환, 출증과 말초혈관성질환등을 포함한 많은 혈관성질환^{5,6)} 합병증을 유발한다. 최근에는 당뇨병 환자에서 간암의 발생확률이 비교적 높은 것으로 보고되고 있다⁷⁻⁹⁾.

당뇨병에 대한 한의학적 관점에서 祝謙予는 糖尿病을 氣陰兩虛型, 隱虛火旺型, 燥熱入血型, 痰血阻絡型, 隱陽俱虛型으로 나누었는데¹⁰⁾ 丹梔逍遙散加減方은 肝鬱化熱氣陰兩傷으로 인한 당뇨병에 疏肝清熱 益氣滋陰法을 써서 치료하는 主方으로 사용된다. 丹梔逍遙散加味¹¹⁾에 당귀대신 活血祛瘀, 凉血消癰, 除煩安神 작용¹²⁾이 강한 단삼을 넣고 여기에 갈근, 천화분, 생지황을 加味한 복합방으로써 心火로 인하여 유발

된 慢性糖尿病中 氣陰兩虛型과 隱虛火旺型에 임상상 일정한 효능이 있다고 사료되어 선택되어진 처방이다.

제1형 당뇨병은 유년시기에 개시되는 가장 보편적인 만성질환중 하나로 혀장 β -세포의 면역학적인 파괴의 결과인데¹³⁾, 당뇨병의 동물모델은 혀장샘의 종양 치료제인 streptozotocin(이하 STZ)을 정상 실험동물에 과량 투여하여 유발한다¹⁴⁾. 실험적인 당뇨 모델에 대한 한약의 효과에 대한 많은 연구 결과에서 혈당에 영향을 미치는 한약재로는 천화분¹⁵⁻¹⁷⁾, 두릅나무근피¹⁸⁾, 벼섯된장¹⁹⁾, 가시오가피²⁰⁾, 산악^{21,22)}, 표고버섯²³⁾, 인삼²⁴⁾, 생지황²⁵⁻²⁷⁾, 지모와 현삼²⁷⁾, 황백²⁶⁾, 황기²⁸⁾, 매밀²⁹⁾, 톳³⁰⁾, 백출³¹⁾, 오미자³²⁾, 흥삼³³⁾, 숙지황³³⁾, 콩나물³⁴⁾, 가공되지 않은 곡물³⁵⁾, 등글래³⁶⁾, 인동초³⁷⁾, 상엽³⁸⁾, 상백피³⁸⁾, 택사³⁹⁾, 구기자⁴⁰⁾, 참깨⁴¹⁾, 누에⁴²⁾, 치커리⁴³⁾, 동과자⁴⁴⁾, 왕겨추출물⁴⁵⁾, 갈근⁴⁶⁾, 죽력⁴⁷⁾, 배⁴⁸⁾ 등이 보고되어 있고, 복합처방²¹⁾으로도 STZ로 유발된 실험동물의 혈당을 감소시키는 효과가 있었다는 보고는 있으나 투여 약물이 혈당의 조절 및 간 기능에 미치는 영향에 관한 연구는 소수에 지나지 않았다.

이에 본 저자는 임상에서 火病에 의한 당뇨에 많이 쓰고 있는 丹梔逍遙散加減方의 당뇨 치료 효능 및 간 기능 보호 효과에 대한 실험을 수행하여 약간의 의견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험 동물

체중 32 g 내외의 웅성 생쥐(ICR strain)를 다물사이언스(주)로부터 구입한 후

한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건 (온도, 21 ± 2 °C; 습도, 50-60%; 명암, 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 단치소요산가감방의 조성 및 약물 추출

실험에 사용한 약재는 동신대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 단치소요산가감방의 구성은 다음과 같다(Table. 1).

Table 1. Prescription of DC

構成藥物	生藥名	用量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	6.0
山藥	<i>Disocoreae Rhizoma</i>	6.0
牡丹皮	<i>Mountan cortex</i>	4.5
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	4.5
茯苓	<i>Poria</i>	4.5
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4.5
白朮	<i>Atractylodis macrocephalae Rhizoma</i>	4.5
丹蔴	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	4.5
麥門冬	<i>Ophiopogonis Tuber</i>	4.5
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.5
龍骨	<i>Fossilia ossis Mastodi</i>	4.5
牡蠣	<i>Ostreeae Concha</i>	4.5
麥芽	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	3.0
총량		60

단치소요산가감방을 전탕하여 0.1L로 농축한 후, 동결건조를 통하여 10.5 g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 당뇨병 유발

실험에 사용한 모든 생쥐는 정상적인 사육환경에서 1 주 이상 적응시킨 후 12

시간 동안 절식시킨 다음 각각의 생쥐에 STZ 60 mg/kg을 24 시간 간격으로 2회 복강투여하여 1차 유발한 다음 3일 후에 STZ 120 mg/kg을 투여하여 고혈당 생쥐

모델을 구축하였다.

2) 실험군 설정 및 약물 투여

대조군은 생쥐에 STZ를 투여하여 체장 섬의 손상을 유발한 다음 약물을 처치하지 않고 자연 치유과정을 거치게 하였다. 실험군은 6 주 동안 단치소요산가감방 추출액 10 mg/kg/day을 구강 투여한 군(CA군)과, 30 mg/kg/day를 투여한 군(DCB군)으로 나누었다.

3) 체중 측정

대조군과 실험군의 체중은 12 시간 동안 절식시킨 다음 측정하였으며, 매주 1 회 6 주 동안 측정하였다.

4) 당대사 측정

(1) 혈당 측정

혈당 측정은 매주 1 회 6 주 동안 실시하였으며, 측정 12 시간 전에 급식을 시킨 다음 꼬리정맥에서 혈액을 취하여 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 측정하였다.

(2) 당내성 검사

정상군은 당뇨를 유발시키지 않은 생쥐를 대상으로 실시하였으며, 실험군은 6 주째의 대조군과 실험군을 대상을 실시하였다. 당내성 검사를 시행하기 전에 12 시간 동안 절식시킨 다음 glucose(1.0 g/kg body weight)를 복강주사 하였다. 그 이후 30, 60, 90, 120분에 각각 꼬리 정맥을 통하여 혈액을 채취한 다음 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 혈당을 측정하였다.

(3) 인슐린 radioimmunoassay

생쥐에서 혈청을 분리한 후 인슐린 농

도는 생쥐 인슐린 RIA kit를 사용하여 radioimmunoassay로 측정하였다. 생쥐 인슐린에 특이적인 guinea pigs에서 얻은 항체와 ^{125}I -Insulin, 생쥐 혈청(항원)를 반응시킨다. 반응 후 free ^{125}I -Insulin를 분리한 후 방사면역측정분석기 v-counter (Cobra 5010 series Quantum, USA)를 이용하여 radioactivity를 측정하였다. 인슐린 농도계 산은 Secu RIA 프로그램을 사용하여 농도를 산출하였다.

5) Transaminase(GOT, GPT) 활성도 측정

실험동물을 심장 천자하여 채혈한 후 혈청을 분리한 다음 glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)와 glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 효소활성도 측정용 kit 시약 (Elitech, France)을 사용하여 340nm에서 photometer(photometer 5010, Germany)로 측정하였다.

6) 간세포의 항산화효소 활성

(1) Superoxide Dismutase(SOD) 추출 및 활성도 측정

대조군과 실험군 생쥐로부터 간조직만을 신속히 분리하여 SOD를 추출하였다. 채취된 간조직은 중류수로 3 회 세척한 후 0.1 mM EDTA와 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 간조직 시료의 4 배량으로 첨가하여 세절한 다음 균질액을 얻기 위하여 homogenizer(Janke & Kunkel, Ultra-Turrax T25, Germany)를 이용하여 4 °C에서 균질화 하였다. 이 균질액으로부터 핵 분핵을 제거하기 위해 4 °C에서 2,000 xg로 5 분 동안 원심분리하였으며, 다시 4

℃의 22,000 $\times g$ 에서 30 분 동안 원심분리하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획으로 분리하였다. 분리된 분획 중 상층액만을 조심스럽게 제거한 후 순수 분리를 위해 16,000 $\times g$ 에서 10 분 동안 원심분리하여 순수 CuZnSOD를 얻었으며, 이 조효소 액을 단백질 분석에 이용하였다. 미토콘드리아에 분포하는 MnSOD를 얻기 위해 전 단계에서의 pellet에 50 mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA 용액 1 mL를 첨가하여 부유시킨 다음 4 ℃에서 22,000 $\times g$ 로 30 분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리한 후 다시 80,000 $\times g$ 로 30 분간 원심분리하여 순수한 MnSOD를 얻었다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay를 이용하였으며, -70 ℃의 deep freezer에 보관하면서 실험에 이용하였다.

분리된 단백질에서 SOD의 활성도를 측정하기 위해 정량한 단백질 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 4 ℃의 저온 상태에서 30 mA로 전기영동하였다. gel은 0.05 M KH₂PO₄(pH 7.8), 1×10⁻⁴ M EDTA, 2.45 ×10⁻³ M NBT를 포함한 용액에서 알루미늄 호일을 덮어 계속 흔들어 주면서 20 분 동안 염색하였다. 다시 gel은 0.05 M KH₂PO₄(pH 7.8), 1×10⁻⁴ M EDTA, 0.028 M TEMED, 2.8×10⁻⁵ M riboflavin 용액에서 15 분 동안 2 차 염색한 후 15 W 형광램프 하에서 단백질 band를 확인하였으며, 그 결과는 densitometer(ImageMaster VDS, Pharmacia)를 이용하여 분석하였다.

(2) Catalase 추출 및 활성도 분석

Catalase 활성도 측정은 Beers and Size r49)의 방법에 준하여 50 mM 인산칼슘

완충액(pH 7.2)에 기질인 10 mM H₂O₂에 효소액을 가하여 최종 반응액이 3.0 mL이 되게한 다음 25 ℃에서 30 초간 반응시키면서 240 nm 파장에서 소실되는 H₂O₂의 양을 측정하였다. 효소 활성도의 단위는 15 초간에 1 mg의 단백이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 μmole 로 나타내었다.

7) 인슐린 면역조직화학

생쥐의 훠장 조직을 적출하여 4 %의 paraformaldehyde를 사용하여 24 시간 동안 고정시킨 다음, 파라핀으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5 μm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 파라핀을 제거한 다음 100 %, 90 %, 80 % ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5 분씩 담구어 핵수과정을 거치게 하였다. 12 시간 후 pH 7.2, 0.1 M의 phosphate buffer saline(PBS, 0.9 % NaCl) 용액에 하룻밤 동안 배양시킨 다음 15 분간 PBS로 세척한 뒤 10 % horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20 분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15 분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 인슐린(Novo castra)를 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2 시간 동안 배양시킨 뒤 15 분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30 분간 배양시킨 후 15 분간 PBS용액으로 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) reagent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30 분간 반응시키고 다시 PBS용액에서 15 분간 세척하였다. DAB 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2 분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에

과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20 초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

8) 통계분석

실험결과 대한 통계분석은 SAS(statistical analysis system)program에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05 이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 성 적

1. 체중 변화

약 30 g의 생쥐에 STZ를 투여하여 고혈당을 유발시킨 다음 치유과정을 거치지 않고 일반적인 식이 상태에서 6 주 동안 체중의 변화를 관찰한 결과 유발 1 주후 약 3 g 정도로 가장 급격히 감소하였으나 이후 점차로 증가하여 6 주 후에는 약 31 g의 체중을 보였다. 약물을 투여한 DCA군과 DCB군에서도 유발 후 1 주에서 가장 감소한 후 점차 증가하였으나 전반적으로 대조군에 비하여 약간 낮은 체중을 보여 주었다(Fig. 1).

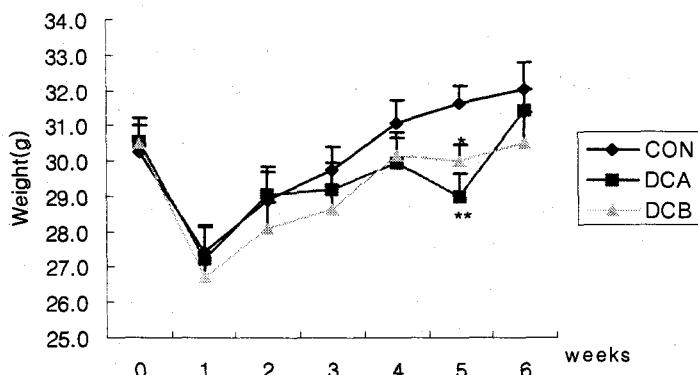


Fig.1. Changes of body weights

Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC(10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob > | T |, Values in the 0.05 and 0.01.

2. 당대사

1) 혈당량의 변화

STZ를 투여한 다음 생쥐의 혈당량이 약 150 mg/dL인 것을 대조군과 실험군으로 구분하였다. 대조군의 혈당량은 유발 후

점차 증가하다가 3 주 째에서 다소 감소하였으나 4 주부터 급격히 증가하여 5 주(293.9±30.21 mg/dL)와 6 주(298.9±27.66 mg/dL)에서 높은 혈당량을 보여 주었다. DCA 군의 혈당량은 3 주(107.9±7.76 mg/dL), 5

주(112.0 ± 13.08 mg/dL)군에서 유발직후 보다 다소 높게 나타났으나, 전반적으로 유발직후 혈당수준을 유지하였다. 전반적으로 대조군에 비하여 1 주군부터 유의성($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)있게 감소하였다. DCB

군에서는 2 주(172.6 ± 27.46 mg/dL), 5 주와 6 주군(183.1 ± 28.92 mg/dL)에서 대조군에 비하여 유의($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)하게 감소한 혈당량을 보여주었다(Fig. 2).

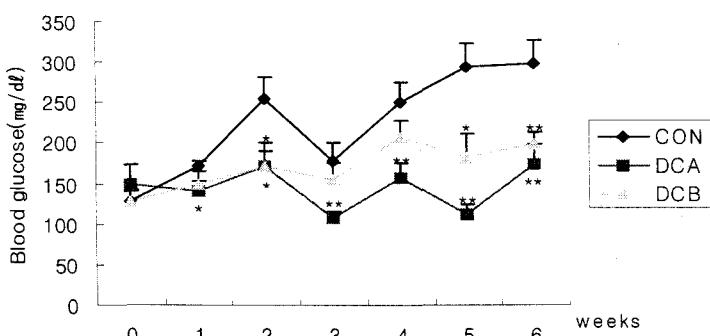


Fig. 2. Plasma blood glucose concentrations measured one time a week from days 5 to 42.

Results are shown as mean values. A streptozotocin was administered on day 0. Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC(10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day),

Mean \pm SD, Standard deviation; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

2) 당내성 검사

STZ를 투여하여 췌장의 Langerhan's islet(이하 췌장섬)를 파괴한 생쥐에 丹梶逍遙散加減方을 6 주 동안 투여한 다음 β -세포의 재생 또는 기능의 회복 정도를 밝히기 위하여 당내성 검사를 실시하였다. 포도당(1.0 g/kg body weight)을 생쥐에 복강주사 한 후 30, 60, 90, 그리고 120 분에서 대조군과 실험군인 DCA군과 DCB군

의 당내성 정도를 검사한 결과, 대조군은 90 분(430.0 mg/dL)에서 가장 높은 혈당을 보여주었고, DCA군은 60 분(427.6 mg/dL)까지는 증가하다가 90 분(352.8 mg/dL)에서 가장 낮은 혈당수치를 보였으나 120 분(393.6 mg/dL)에는 거의 비슷하였고, DCB군은 역시 60 분(459.5 mg/dL)에서 최고치를 보이다가 120 분(335.5 mg/dL)까지 계속 하강하였다(Fig. 3).

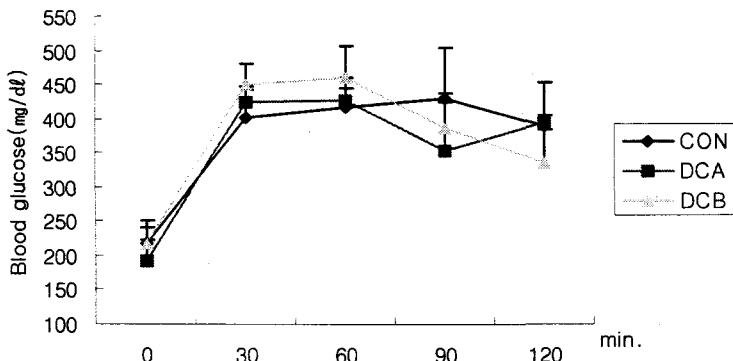


Fig. 3 Blood glucose tolerance test at 42-day from each feeding of DC groups.
Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob > | T |, Values in the 0.05 and 0.01.

3) 혈중 인슐린 농도의 변화

혈청내 인슐린의 농도를 검사하기 위하여 인슐린 radioimmunoassay을 한 결과 정상군(0.815 ± 0.09 ng/mL)에 비하여 대조

군(0.064 ± 0.01 ng/mL)과 실험군의 함량은 극히 저조하였으나, DCA군(0.095 ± 0.05 ng/mL)이 대조군이나 DCB군(0.038 ± 0.02 ng/mL)에 비하여 다소 높았다(Fig. 4).

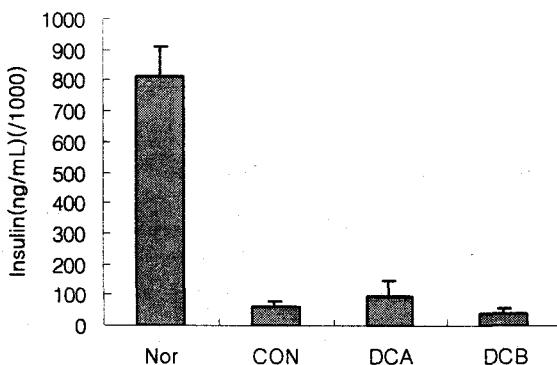


Fig. 4. The changes of serum insulin level.

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob > | T |, Values in the 0.05 and 0.01.

3. Transaminase(GOT, GPT) 활성 변화

STZ를 투여하여 고혈당을 유발시킨 생쥐의 6 주후 혈중 GOT의 농도 변화를 측정한 결과 대조군(450.3 ± 60.57 mg/dL)에서 가장 높게 나타났으며, DCB군(341.4 ± 27.93

mg/dL)에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 5a). GPT의 농도는 대조군(113.6 ± 28.49 mg/dL)에서 가장 높게 나타났으며, DCA군(89.9 ± 8.26 mg/dL)과 DCB군(65.0 ± 1.60 mg/dL)은 정상군과 유사한 농도로 나타났다(Fig. 5b).

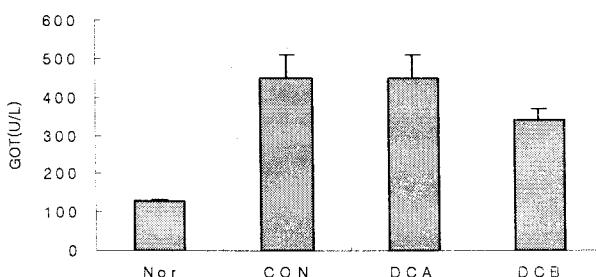


Fig. 5a. Plasma glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT, mg/dL) measured at 6 weeks.

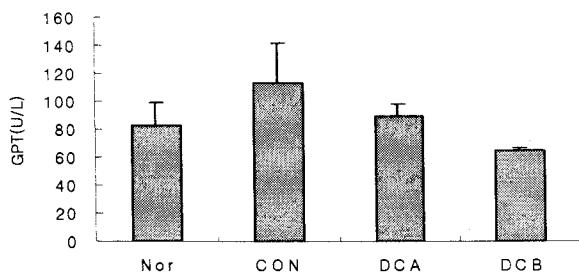


Fig. 5b. Plasma glutamic-pyruvic transaminse(GPT, mg/dL) measured at 6 weeks.
Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean \pm SD, Standard deviation; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

4. 간세포의 항산화효소 활성

1) SOD 추출 및 활성

간조직에서 SOD의 활성을 측정한 결과 MnSOD는 정상군($6,056 \pm 20$)에 비하여 대조군에서는 다소 증가하였으며 실험군인

DCA군($12,190 \pm 32$)에서는 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였으며, DCB군($8,194 \pm 93$)에서도 다소 증가하였다(Fig. 6a,6c). Cu ZnSOD의 활성은 정상군($13,180 \pm 89$)에 비하여 대조군($17,136 \pm 133$)에서 증가하였다.

실험군인 DCA군($20,711 \pm 40$)의 활성은 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였으며,

DCB군($15,679 \pm 163$)은 대조군에 비하여 낮은 활성을 보여주었다(Fig. 6b, 6c).

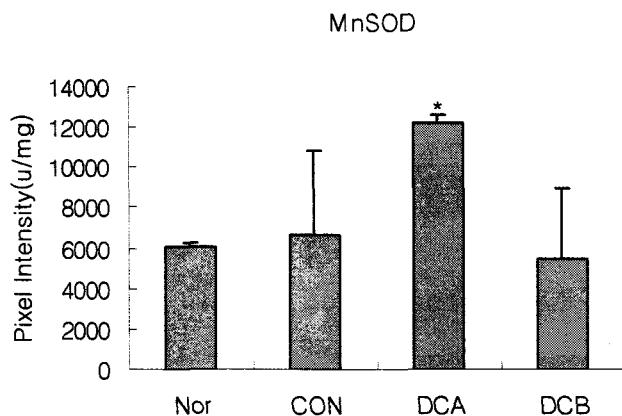


Fig. 6a. The changes of MnSOD activities.

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean \pm SD, Standard deviation; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

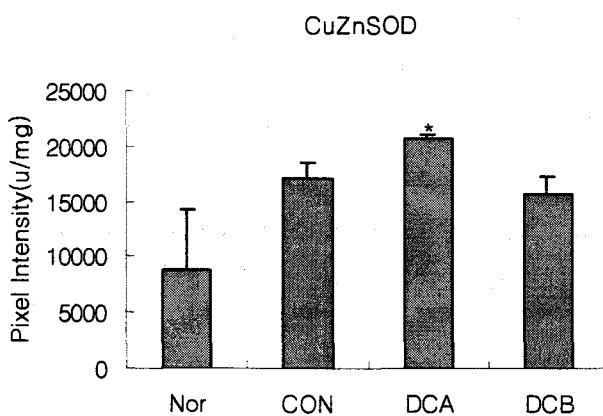


Fig. 6b. The changes of CuZnSOD activities.

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean \pm SD, Standard deviation; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

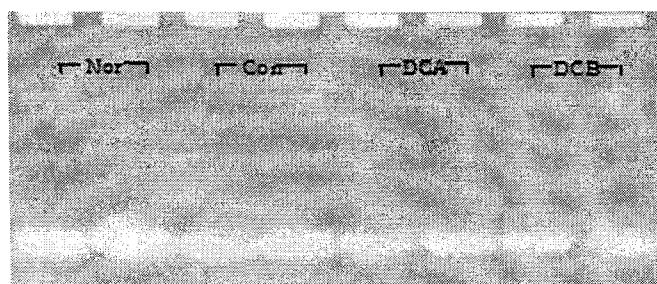


Fig. 6c. SOD activity assayed in the liver of mouse on non-denaturing polyacryamide gel.

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean \pm SD, Standard deviation; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

2) Catalase 추출 및 활성

간세포의 catalase의 활성을 측정한 결과 정상군에 비하여 대조군과 실험군 모두에서 높게 나타났다. 실험군인 DCA군은

대조군에 비하여 약간 높게 나타났으며, DCB군은 대조군에 비하여 다소 낮게 나타났다(Fig. 7).

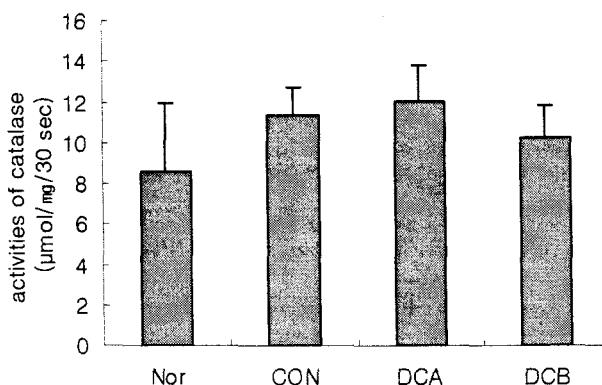


Fig. 7. The changes of catalase activities($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ reduced/ mg protein/30 sec).
Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; DCA, feeding of DC((10 mg/kg/day), DCB, feeding of DC(30 mg/kg/day), Mean \pm SD, Standard deviation; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

5. 조직학적 변화

1) 혀장섬의 insulin-면역조직화학

췌장조직의 인슐린-면역조직화학 결과 정상군의 혀장섬에 존재하는 β -세포는 인슐린에 강한 양성반응을 보여주었다(Fig. 9A). 그러나 대조군의 혀장섬에서 관찰되는 β -세포는 정상군에 비하여 소수 관찰되었을 뿐만 아니라 면역활성도 낮았다

(Fig. 9B). DCA군 또한 혀장섬의 크기는 정상군과 비슷하였지만 인슐린에 양성반응을 보이는 β -세포들은 소수 관찰되었다 (Fig. 9C). DCB군에서는 혀장섬의 크기는 작았지만 대부분의 세포들이 인슐린에 높은 양성반응을 보이는 β -세포들이었다 (Fig. 9D).

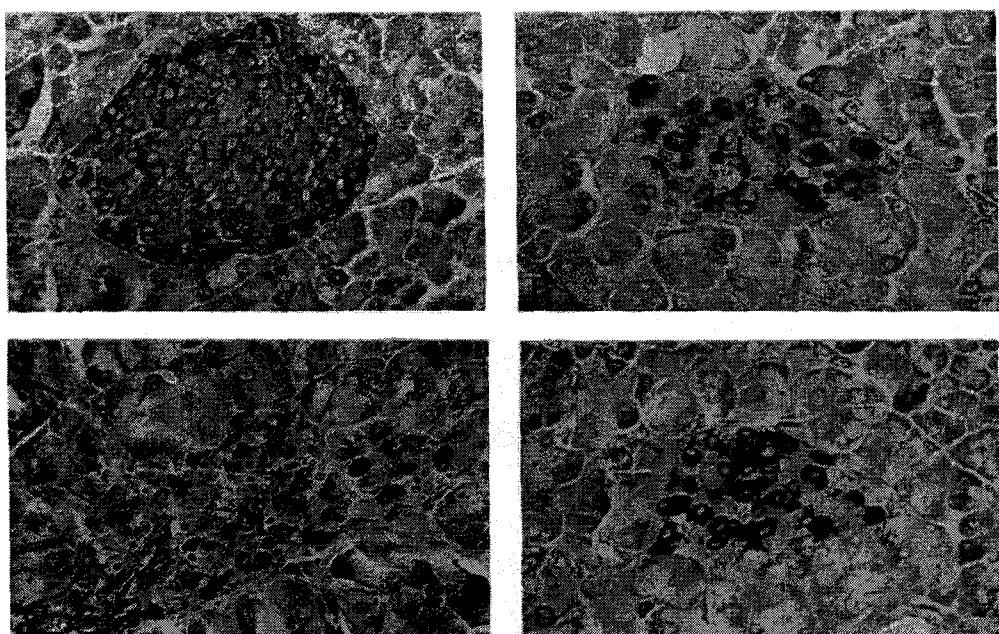


Fig. 9. Insulin-immunohistochemistry at 6 weeks.

A, normal group; B, control group administered with STZ; C, feeding of DC((10 mg/kg/day), D, feeding of DC(30 mg/kg/day), LI, Langerhan's islet. Insulin-immunostain. $\times 200$.

IV. 고찰

丹梔逍遙散加減方은 清熱滋陰, 疏肝解鬱 효능이 있는 처방으로 알려져 있다. 본 연구에서는 실험상 개별약물로 당뇨에 효과가 있다고 검증이 된 천화분¹²⁻¹⁴⁾과 생지황

²⁵⁻²⁷⁾, 갈근⁴⁶⁾을 제외한 상태에서 혈당과 간 기능에 미치는 명향을 밝히고자 수행하였다. 祝謙予⁵⁰⁾의 당뇨처방은 주로 脾腎의 부족으로 인한 氣陰兩傷의 기전을 근간으로 보기 때문에 황기, 생지황, 창출, 원삼, 단삼, 갈근을 重用하고 여기에 滋陰시키는

옥죽, 천화분, 구기자, 맥문동, 오미자와 清熱시키는 황금, 황련, 황백, 그리고 补腎하는 속단, 토사자, 오래된 당뇨에는 活血시키는 계혈등을 주로 사용한다. 丹梔逍遙散加減方은 祝謹予의 處方으로써 스트레스에 의해 갑작스런 혈당의 상승과 함께 胸滿, 口苦, 目赤, 粘性淚液, 콜레스테롤과 Triglyceride 및 LDL의 증가, 不整脈 등과 같은 증상이 있는 心火로 인한 당뇨병에 처방되고 있다.

당뇨병 환자에서는 기본적으로 혈당의 상승과 함께 일차적으로는 체중의 감소가 나타난다⁵¹⁾. 본 연구의 실험결과 체중은 1 주 이후 대조군에 비해 실험군이 전반적으로 낮게 나타난다. 이는 혈당추이를 고려할 때 혈당의 상승으로 인한 체중의 감소가 아닌 대사의 항진으로 인한 체중의 감소로 사료되었다.

고혈당 유발 후 6 주 동안 혈당의 변화를 측정한 결과 대조군에 비하여 약물을 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비하여 보다 효과적으로 조절되고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 6 주 후 당내성검사를 실시한 결과 DCB군에서 나중에 약간 떨어지는 것을 제외하고는 전반적으로 실험군이 대조군에 비하여 당내성에 유의한 효과를 보여 주지 않았다. 이와 같은 결과를 볼 때 종자유⁵²⁾와 같은 β -세포의 재생이나 보호에는 丹梔逍遙散加減方が 관여하지 못하는 것으로 사료되었다. 혈중 미량의 인슐린 함량을 측정하는 인슐린 방사선면역활성 측정 결과 정상군에 비하여 실험군과 대조군 모두에서 매우 낮게 나타난 결과는 丹梔逍遙散加減方의 투여가 STZ로 파괴된 脾장섬 β -세포의 재생에 영향을 미치지 않았음을 확인할 수 있었다. 또한

췌장의 인슐린 면역조직화학 검사상에서 실험군의 β -세포가 대조군에 비하여 인슐린 면역활성이 약간 높게 관찰되었으나 현저한 차이가 없었던 결과와 일치된 소견으로 생각되었다.

혈중 GOT와 GPT는 주로 간세포의 파괴로 인해 세포내에서 혈중으로 유리되는 효소인데⁵³⁾ 이 활성수치가 높다는 것은 간의 급성염증을 시사하며, 두 효소의 활성변화는 간세포 손상정도와 기능을 나타내는 지표로 활용된다. 본 연구의 결과 GOT 활성도는 DCB군에서 약 24% 낮은 결과를 보여주었고 DCA군에서는 대조군과 비슷한 결과를 보였다. GPT 활성도는 DCA군이 대조군보다 낮게 나타나고 DCB군에서는 보다 더 낮게 나타나 약액의 농도(유효성분의 투여량)가 효소활성과 관련성이 있음을 보여주었다. 이를 통해 丹梔逍遙散加減方은 간세포의 염증성파괴로부터 보호 또는 억제하는 효과가 있는 것으로 사료되었다. 또한 SOD 효소는 간세포 내에서 superoxide radical을 H2O2로 전환시키는 효소인데 포유동물에서는 세포질에 CuZn-SOD⁵⁴⁾가 있고, mitochondria내에는 Mn-SO D^{54,55)}가 있다. Catalase는 과산화수소를 제거하는 기능이 있다⁵⁶⁾. CuZn-SOD와 Mn-SOD 그리고 Catalase 모두에서 DCA군이 대조군에 비해 활성도가 높게 나타나는 것으로 보아 간세포 재생에 관여하는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 丹梔逍遙散加減方은 STZ로 유발된 고혈당 생쥐의 혈당을 감소시키는 효과가 있으며, 약물의 농도에 따라 간세포를 염증으로부터 보호 또는 억제하는 효과와 간세포의 재생에 도움을 주는 것으로 나타났다. 그러나 당내성이나

인슐린의 양에는 특별한 효과가 없는 것으로 보아 본 실험에 사용된 丹梔逍遙散加減方은 제2형 당뇨병에 보다 효율적으로 응용될 수 있는 약물이라고 할 수 있을 것이다.

V. 결 론

丹梔逍遙散加減方이 streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향을 밝히고자 물추출액을 6 주 동안 경구투여 하면서 당대사, 간기능, 항산화효소의 활성, 췌장조직의 인슐린 면역조직화학을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

혈당량은 실험군인 DCA군이 대조군에 비해 1 주 이후부터 유의성($p<0.05$ 또는 $p<0.01$)있게 감소하였으며, DCB군에서는 전반적으로 대조군에 비하여 낮게 나타났으며 2주와 5, 6 주군에서는 유의성($p<0.05$ 또는 $p<0.01$)있게 감소하였다. 당내성검사 결과 실험군은 대조군에 비하여 유의한 효과를 나타내지 않았다. 혈중 GOT활성은 대조군에서 가장 높았으며, DCB군에서 가장 낮게 나타났다. GPT는 대조군에서 가장 높게 나타났으며, DCA군과 DCB군은 정상군과 유사하였다. 간세포의 SOD와 Catalase활성은 DCA군이 가장 높았고 DCB군이 가장 낮았다. 췌장섬의 인슐린-면역조직화학 결과 췌장섬 β -세포의 면역활성은 대조군과 실험군 모두에서 소수 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 丹梔逍遙散加減方은 STZ로 유발된 고혈당 생쥐의 혈당강하와 간 기능 보호에 유의한 효과가 있는 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 동신대학교 산업용가속기이용생물연구센터 지원에 의한 것입니다.

参考文献

- Friedman J M. 2003. A war on obesity, not the obese. *Science* 299: 856-858.
- Exton J H, Corbin J G, Harper SC. 1972. Control of gluconeogenesis in Liver V. (Effects of fastings, diabetes, and glucagon on lactate and endogenous metabolism in the perfused rat liver). *J Biol Chem* 247: 4996-5003.
- 정영희, 박병주, 이태희, 최금희, 전성현. 2000. 당뇨쥐의 지질대사에 미치는 capsaicin식이의 영향. *대한비만학회지* 9(4): 246-255.
- Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, Levi M. 2002. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J Biol Chem* 277, Issue 21: 18919-18927.
- Aboot RD, Donahue RP, Macmahon S W, Reed DM, Yano K. 1987. Diabetes and the risk of stroke. *J Am Med Assoc* 257: 949-952.
- Wolf PA, Kannel WB, Verter J. 1983. Current status of risk factors for stroke. *Neurol Clin* 1: 317-343.
- Vecchia C, Negri E, Franceschi SD, D'Avanzo B, Boyle P. 1994. A case-co

- ntrol study of diabetes mellitus and cancer risk. Br J Cancer 70: 950-953.
8. Kingston ME, Ali MA, Atiyeh M, Donnelly RJ. 1984. Diabetes mellitus in chronic active hepatitis and cirrhosis. Gastroenterology 87: 688-694.
9. Lawson DH, Gray JM, McKillop C, Clarke J, Lee FD, Patrick RS. 1986. Diabetes mellitus and primary hepatocellular carcinoma. Q J Med 61: 945-955.
10. 祝謙予. 1993. 臨證驗案精選. 學苑出版社. 中國. p 112.
11. 史宇廣. 1992. 消渴專輯. 中國古籍出版社. 中國. p 16.
12. 全國韓醫科大學本草學教授共著. 1995. 本草學. 永林社. 서울. p 420.
13. Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 24: 1428-1436.
14. Rakieten N, Rakieten ML, Nadrini M V. 1963. Studies on the diabetogenic actions of STZ. Cancer Chemother Rep 29: 91-97.
15. 김경호, 윤종화, 김갑성, 유성현. 1993. 천화분수침이 白鼠의 Langerhans 도내 형태학적 변화에 미치는 영향. 대한침구학회지 10(1): 235-246.
16. 문석재. 1982. 천화분 추출액의 가토 혈당 농도에 미치는 영향에 관한 연구. 동서의학 7(1): 38-45.
17. 옥은성. 1994. 천화분이 정상 및 diabetic rat의 혈당에 미치는 영향. 호남대학교 학술논문집 15: 190-194.
18. 이은방, 신국현, 김운자, 김옥경, 이명환. 1991. 두릅나무근피 추출물의 혈당 강하 작용. 생약학회지 22(1): 63-64.
19. 김기영, 윤종원, 송치현, 양병근, 정상철, 허남정, 하상오, 금교혁. 2000. 벼섯된장 추출물의 당뇨 유발 흰쥐에 대한 혈당강하 효과. 한국균학회지 28 (3): 126-129.
20. 박호기, 김태수, 박문수, 최인녹, 장영선, 김규성. 1994. 가시오가피의 삽목번식방법(挿木繁殖方法). 한국약용작물학회지 2(2): 133-139.
21. Kwak KH, Song HJ, Kim SH. 1993. The Effects of Boyangwhanohtang and Kami-boyangwhanohtang on intravascular coagulation induced by endotoxin in rats. J Soc Oriental Pathology 8(1): 388-398.
22. Kim MH. 1997. Effects of H₂O fraction of *Dioscorea japonica* Thunb with vitamin E on glucose and lipid metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. J Korean Soc Food & Cooley Science 13(4): 500-506.
23. Yang BK, Kim DH, Song C H. 2002. Production of *Lentinus edodes* Mycelia in submerged culture and It's hypoglycemic effect in diabetic rats. J Korean Soc Germ. 30(2): 131-135.
24. Park SH, Cho JS. 1977. Effects of Korean Ginseng on metabolism of glucose in rats. J Kyung-buk Med Sch 18(2): 158-165.
25. Kim JS, Na CS. 2004. Effect of *Rehmanniae Radix* and pear phenolic compound on the STZ-treated mice for induction of diabetes. J Korean Soc

- Food Sci 33(1): 66-71.
26. 최해윤, 정태영, 서부일, 김종대, 박동일. 2003. Streptozotocin으로 유발된 당뇨백서에서 수종의 한약재가 혈당강하에 미치는 영향. 대한본초학회지 18(2): 121-127.
27. 윤석운, 정희재, 정승기, 이형구. 1996. 폐소의 치료에 관한 문헌적 고찰. 한방 성인병학회지 2(1): 63-73.
28. Ko ST, Lim DY, Lee SH. 1984. Effect of Astragali Radix water extract on plasma level of glucose in rabbits. J Soc Pharmacology 14(1): 45-46.
29. 박성진, 이정선, 이명현, 권태봉, 한찬규, 정철원, 성기승. 2000. 발아메밀이 본태성 고혈압쥐의 혈압, 혈당 및 혈중 지질수준에 미치는 영향. 한국식품 과학회지 32(1): 206-211.
30. Kim YK, Kang HS., Kim GJ, Kim H S. 1997. Effects of *Hijikia fusiforme* (Harvey) Okamura extract on blood glucose and lipid composition in streptozotocin induced hyperglycemic rats. J Inst Agri 1(1): 24-29.
31. Kim YH, Song DK, Wie MB. 1988. Hypoglycemic effects of Atractylodis Rhizoma in rats with streptozotocin-induced hyperglycemia. J Korean Soc Pharmacology 24(1): 125-134.
32. Choi HI, Chung JC, Kim C. H. 1998. Effect of *Rhois Galla* extract on pancreatic glucokinase and hexokinase activities of interleukin-1 β -induced diabetes mellitus mice. J Dong kuk Korean Medical Inst. 7(1): 65-74.
33. 김학성, 성연희, 양재원, 전병선, 박웅양, 박우규, 오기완, 최강주. 1997. 홍삼 및 숙지황의 혼합추출물의 고혈당강하 작용. 고려인삼학회지 21(3): 169-173.
34. 김정인, 강민정, 배세연. 2003. Streptozotocin 유발 당뇨 쥐에 있어서 콩나물 메탄을 추출물의 혈당강하효과. 한국식 품영양과학회지 32(6): 921-925.
35. 장양수, 이종호, 엄영람, 조은영, 박현영, 황재관, 여익현. 2000. 관상동맥경화증 환자에서 전곡섭취가 지질과산화 및 혈중 인슐린과 호모씨스테인 농도에 미치는 영향. 순환기 30(6): 693-701.
36. Choi HJ. 2004. Effects of *Polygonatum odoratum* on biological activities in diabetic rats. J Injae 19(1): 793-810.
37. Cho YJ, Kim HA, Bang MA. 2000. The Effect of *Japonica Tumbo* on blood glucose level and lipid metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. J Domestic Science 3: 15-32.
38. Koo SJ. 2000. Screening on anti-hyperglycemic effect of mulberry leaves and *Cortex Radicis* in alloxan-induced mice. J Domestic Science 4(1): 31-38.
39. Yim SJ, Park JE. 2002. Effects of H2O fraction of *alisma canaliculatum* with chromium on blood glucose levels and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci 34(4): 725-731.
40. Hong ND, Kim NJ, Yoon HK. 1994. Abstracts of the 24 th annual convention; pharmacological effects of *Lycium*

- m chinense J Pharmacognosy 25(1): 264-271.
41. 이종호, 허갑범, 강명화, 박기문, 류수노, 이봉호. 1999. 참깨 세사민이 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 혈청지질 농도에 미치는 영향 . 한국국제농업개발학회지 1(3): 312-324.
42. 고진복, 오세원. 2000. 누에분말이 당뇨암쥐의 혈당, 지질 및 단백질 농도에 미치는 영향. 자연과학논문집 8: 1-11.
43. 박옥연, 박영범, 최근표. 1999. 강원도 산 치커리의 생리활성 기능 검색 . 도립 강원전문대학 논문집 2: 37-41.
44. Yim SJ, Kim AR. 2004. Effects of *B enincasa hispida* seeds intake on blood glucose and lipid levels in streptozotocin induced diabetic rats. J Korean nutrition Soc 37(4): 259-265.
45. Kim HK. 1997. In vitro inhibitory activity on rat intestinal Mucosa α -glucosidase by rice hull extract. J Korean Soc Food Sci 29(3): 601-608.
46. Kim JS. 2004. Effect of a alcohol detoxification beverage (ADB) contained Radix puerariae and Bambusae caules in Liquamen Phyllostachyos on the alcohol administered mouse. J Korean Soc Food Sci Nutr 33(2): 318-323.
47. 장경선, 최찬현, 정동주. 2001 . 대나무숯 제조과정에서 나오는 죽력이 streptozotocin으로 유발된 당뇨 생쥐에 미치는 영향(Ⅱ). 동의병리학회지 15(3): 28-35.
48. 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(6): 1107-1111.
49. Beers RJ, Sizer IWA. 1952. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of H₂O₂ by catalase. J Biol Chem 195: 133-140.
50. 史宇廣. 1992. 소갈전집. 중국고적출판사. 중국. p 14.
51. 이병래, 차종희, 박재윤, 박영진, 박평심. 2001. 당뇨병 환쥐에서 식이 제한급여가 장기의 항산화효소 활성도 및 체중에 미치는 영향. 한국영양식량학회지. Vol.30. No.3. 521-527.
52. 김수조, 신인철, 서대규. 1988. Alloxan 유발 당뇨 생쥐에 미치는 Evening Primrose 종자유의 영향. 환경과학논문집 9: 113-123.
53. Hwang JU, Lee KB. 1969. Studies on glutamic-oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases in the developing chick embryo. Journal of Woosuk Medical School 6(1): 111-119.
54. Ko JW, Lee BR, Choi KJ. 2002. The effects of high glucose on paraquat-induced cell injury in human retinal pigment epithelial cells. Korean J of Ophthalmology 43(5): 883-889.
55. Korbashi P, Kohen R, Katzhendler J, Chevion M. 1978. Iron mediates paraquat toxicity in Escherichia coli. J Biol Chem 253: 8143-8148.
56. Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. J Biol Chem 264: 7761-7764.