韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 18(1) : 15 – 21 (2010)

Streptozotocin으로 유발한 당뇨병성 쥐에서의 당뇨병성 백내장과 망막병증에 대한 구기자와 황기 혼합 추출물 등의 면역 조절 및 예방 효과

전윤희*・문준웅**・권혁중***・정용준*・안치선*・김해란*・허선진*・임병우*†

*건국대학교 의료생명대학 생명과학부, **건국대학교 의학전문대학원 안과학 교실, ***건국대학교 의학전문대학원 가정의학과

Effects of *Lycii fructus* and *Astragalus membranaceus* Mixed Extracts on Immunomodulators and Prevention of Diabetic Cataract and Retinopathy in Streptozotocin-induced Diabetes Rat Model

Yun Hui Jeon*, Jun Woong Moon, Hyuk Jung Kweon***, Young Jun Jeoung*, Chi Sun An**, Hai Lan Jin**, Sun Jin Hur** and Beong Ou Lim*†**

**College of Biomedical & Health Science, Department of Life Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.*
***Department of ophthalmology, Konkuk University Medical Center, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea.*
****Department of Family medicine, Konkuk University Chungju Hospital, Chungju 380-704, Korea.*

ABSTRACT: This study was conducted to investigate the effects of *Lycii fructus* and *Astragalus membranaceus* mixed extracts on immunomodulators and prevention in a streptozotocin-induced diabetes rat model. A total of 28 male rats were divided into four dietary groups and fed a commercial diet (A), commercial diet plus induced diabetes by a streptozotocin (STZ) injection (B), induced diabetes by STZ plus medicinal crop extracts(I&H®) diet (C), and medicinal crop extracts (I&H®) diet (D). Immunoblotting analyses revealed cytokine expression, and ELISA analyses revealed immunoglobulin E and nitric oxide production. As a results, the tumor necrosis factor-α (TNF-α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) as a inflammatory cytokine were decreased. Interleukin-6 (IL-6) and signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) cytokine related in diabetes expression through JAK/STAT3 pathway were also decreased. Furthermore, immunoglobulin E and nitric oxide production were decreased in the serum and lens, respectively. These results suggest that *Lycii fructus* and *Astragalus membranaceus* mixed extracts provide positive effects on immunomodulators and prevention in diabetes and eye disease complications.

Key Word **:** *Lycii fructus*, *Astragalus membranaceus*, Mixed Extracts, Diabetes, Cytokine, Diabetic Cataract, IgE

서 언

생활수준의 향상과 서구화된 식습관으로 인해 대표적인 성인병의 하나인 당뇨병 환자가 증가하고 있다. 당뇨병으로 인한 고혈당 상태에서는 다양한 세포로부터 염증 인자의 분비가 촉진되고 지방 세포에서 급성 반응 인자들의 형성과 분비가 유발 된다 (Guha *et al*., 2000; Lin *et al*., 2001; Aronson *et al*., 2004). 당뇨병에 의한 고혈당 및 최종 산화물은 눈, 신장 및 혈관세포의 손상을 유발하고 염증세포들이 손상부위로 침윤되어 더 많은 세포의 손상을 유도하게 된다. 최근에는 당뇨병 및 그 합병증의 원인과 병태생리를 보다 정확히 이해하고, 기존 약제의 제한점을 극복하여 보다 완벽한 치료제 개발을 위한 분자생물학적 연구가 활발히 이루어지고 있는데 (Moller *et al*., 2001), 최근까지의 연구들을 배경으로 하여 새로운 치료제 개발을 위한 이론적 근거로 여러 전사인자들이 거론되며, 면역 조절인자, 염증인자, 성장인자, cytokine 등의 초점에 맞춘 연구들이 보고되고 있다. 또한, 당뇨병 자체보다 합병증이 더욱 문제가 되는 경우가 많아 당뇨 합병증에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있는 실정이다 (Pfeiffer *et al*., 1997; Boulton *et al*., 1997). 따라서 당뇨병 및 당뇨 합병증을 치료 및 예방하기 위해서는 여러 가지 신호전달 물질과 성장인자, cytokine, 면역 조절인자 및 염증인자들과의 상호 작용을 통하여 당대사와의 이상과 발현의 상관관계를 분석하고 규명하는 것이 당뇨병 및 그 합병증 질환을 치료 및 예방할

†Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3570 (E-mail) beongou@kku.ac.kr
Received 2009 August 28 / 1st Revised 2009 December 14 / Accepted 2010 January 9

수 있는 획기적인 치료제의 개발에 필수적이라 볼 수 있다. 또한 최근에는 안전성이 입증된 생약재를 이용하여 당뇨병 및 당뇨 합병증을 치료 및 예방하기 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 구기자는 한방에서 인삼과 함께 독성이 없는 상약 군으로 취급되고 있으며, 최근에는 간 독성보호효과 (Cho *et al*., 2004; Kang *et al*., 2006), 노화억제효과 (Lee *et al*., 2005), 면역증진효과 (Park *et al*., 2000), 항산화 효과 (Park *et al*., 2005), 심혈관 관련 질환 예방 (Park *et al*., 2007) 등 다양한 연구가 보고 되고 있다. 또한 오래전부터 한방에서 시력에 좋다고 알려진 결명자가 산화적 스트레스 억제효과 및 free radical 소거작용의 역할도 하는 것으로 알려지고 있다 (Choi *et al*., 1997; Choi *et al*., 1994). 둥글레의 어린 순은 식용으로 이용하기도 하고, 한방과 민간에서는 자양, 강장, 영양불량, 폐결핵으로 인한 기침 및 당뇨로 인한 지갈 등의 약재로 쓰이고 있는데 (Lee, 1985), 특히 당뇨병 치료 및 혈당강하를 위해 널리 쓰이고 있다 (Lim *et al*., 1995; Lim and Kim., 1995). 식용 및 약용으로 사용되는 복분자는 생체내 면역체계에서 항체 생성에 중요한 역할을 하는 human B세포와 T세포주의 생육을 촉진한다고 알려져 있고 (Lee *et al*., 2003), 면역세포에서 분비하는 cytokine의 하나인 IL-6와 TNF-α의 분비를 촉진하는 것으로 나타났다 (Park *et al*., 2004). 황기는 한방에서 이뇨, 강장, 혈압강하, 혈당강하, 면역증강, 항종양, 항바이러스 작용 뿐만 아니라 항산화 활성 등 다양한 생리활성 작용이 있는 것으로 밝혀져 있다 (The Compilation Committee on Teaching Materials of Oriental Medicine College., 2007). 따라서 본 연구에서는 앞서 언급한 구기자 및 황기가 포함된 추출혼합물의 급여가 당뇨로 인해 발생된 염증 및 면역 관련 인자 발현의 조절 및 망막병증에 대한 치료 효과에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 생약재 추출혼합물(I&H®)은 구기자 추출분말, 황기 추출분말, 결명자 추출분말, 둥글레 추출분말, 복분자 추출분말을 포함하는 건강기능식품 보조제 I&H®이며 적색의 액상 형태로 주된 영양소는 칼슘, 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D 이다. 주된 영양 성분에 더해 혼합 추출물을 추가하여 당뇨병 및 당뇨 합병증인 망막병증에 대해 면역 조절 및 예방을 하고자 공급받아서 실험에 사용하였다. 생약재 추출혼합물(I&H®)의 조성 및 배합비율은 Table 1에 나타내었다. 단, 상기에서 Ahngook extracts mixtureV-1은 구기자 추출물 30%, 황기 추출물 27%, 결명자 추출물 25%, 둥글레 추출물 10% 및 복분자 추출물 8%가 혼합된 혼합 추출물이다.

Table 1. Formulation of I&H®.

Items	Compositon (%)
Seaweed calcium	4.375
Fermented organic calcium	4.050
Liquid suger	25
Blueberry extracts	1
Anguk extracts mixtureV-1	1
Pectin	1
VitaminC	0.5
DL-Alanine	0.4
Red pigment	0.35
Blueberry flavor	0.35
Gelling agent	0.2
Foremilk powder	0.1
Marigold extracts powder	0.05
Milk protein	0.03
VitaminA acetate	0.021
Sucralos	0.02
Magnesium chloride	0.01
VitaminD3	0.01
β-carotin	0.01
Routine	0.01
Astaxanthin	0.01
VitaminB3	0.001
VitaminB6	0.001
Zinc oxide	0.001
VitaminB2	0.0005
Folic acid	0.0003
VitaminB1 hydrochloride	0.0003
vitaminB12	0.0001
Purified water	61.4998
Total	100

2. 시 약

Streptozotocin (STZ)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Lysis buffer (T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent)는 Thermo scientific (Chicago, IL, USA)에서 구입하였다. 항체 TNF-α, STAT1, pSTAT1, STAT3, pSTAT3, STAT6, pSTAT6는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 IL-4, IFN-γ는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 iNOS는 Upstate Biotechnology (Lake placid, NY, USA) 에서 구입하여 사용하였고, 그 외 일반 시약은 Sigma (St. Lousi, MO, USA) 제품을 사용하였다.

3. 동물 및 식이, 당뇨 유발

실험동물은 체중이 140~230 g인 Sprague-Dawely계 rat를 오리엔트 바이오사 (Songnam, Korea)에서 구입하여 이용하였다. 일반 실험용 동물사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간

실험환경 (온도 22.2℃, 습도 55~66%, 명암주기 12시간으로 자동조절)에서 적응시킨 다음 실험에 착수하였다. 실험군은 평균체중이 유사하도록 난괴법에 의해 그룹당 7마리씩 4개군으로 나누어, 일반사료 급여군 (Control), 당뇨대조군(Streptozotocin, 이하 STZ), 당뇨를 유발 시킨 다음 생약재 추출혼합물을 투여한 군 (이하 STZ + I&H®) 그리고 추출혼합물만 투여한 군 (이하 I&H®)으로 분류한 다음 12주간 실험식이를 급여하여 사육하면서 실험에 공시하였다.

스트렙토조토신 (Streptozotocin)에 의한 당뇨 유발은 Cho 등의 방법 (Cho and Bang., 2004)을 응용하여 실시하였다. Citrate buffer (pH 4.3)에 녹인 streptozotocin 60 ㎎/㎏을 rat의 복강으로 1일 1회 5일간 주사하고 이를 4주간 반복하여 당뇨병과 백내장을 유발시켰다. 혈당치 (㎎/㎗)는 꼬리정맥에서 혈액을 채취한 후 혈당 측정기 (CareSenseII GM 505C, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하고, 고혈당인 실험동물만을 당뇨병이 유발된 것으로 인정하였다. 당뇨병이 유발된 rat를 선발하여 액상 형태인 실험 식이 20 ㎖을 1일 1회 정해진 시간에 경구투여한 후 실험에 공시하였다. rat의 체중변화는 매주 1회 측정하였으며, 12주간의 실험 사육이 끝난 후 실험동물은 12시간 절식시키고 에테르 마취한 후 심장에서 전혈을 채취하고, 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 분리하고, 떼어낸 Liver와 Spleen은 무게를 측정한 후 액체 질소로 급냉하여 실험 전까지 −70℃에 보관하면서 사용하였다.

4. Immunoblotting을 이용한 cytokines 측정

조직 100 ㎎을 잘라 lysis buffer를 가한 후 혼합하여 4℃, 12000 rpm, 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등이 제거된 상층액을 새로운 e-tube로 옮긴다. 단백질 농도는 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 ㎍의 lysate를 8~15% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 300 mA로 60분간 transfer하였다. 그리고 membrane은 5% skim milk가 포함된 blocking buffer에 1시간 동안 antibody의 비 특이적 결합 (non-specific binding)을 억제 시킨 후, 1차 항체로 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 1X TBS-T로 5분간 각각 6번 씻어내고, Horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시킨 후, 다시 1X TBS-T로 5분간 각각 6번 씻어내었다. 그 후, ECL kit에 반응시키고, 현상 및 분석하였다.

5. Nitric oxide(NO) 생산량 측정

Streptozotocin에 의해 손상된 Lens로부터 생성된 NO의 양은 griess reagent을 이용하여 측정하였다. 각 조직을 buffer에 넣어 분쇄한 후, 원심분리하여 상층액을 얻었다. 조직의 상층액을 nitrite 측정을 위해 100 ㎕를 96-well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 상온의 어두운 곳에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 UV 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 사용하여 흡광도 측정 후 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

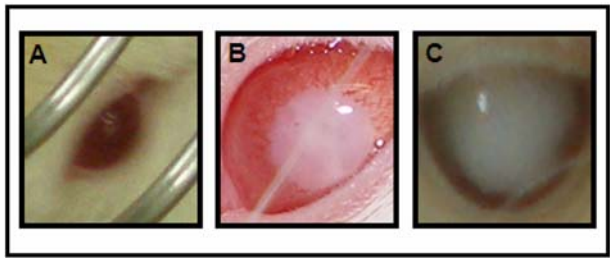

Fig. 1. The change of occurrence of a cataract in the eyes. (A) 0 week, (B) 2 weeks, (C) 4 weeks.

6. ELISA을 이용한 IgE항체 측정

Sandwich ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하여 측정하였다. 측정 방법은 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer와 IgE 일차항체를 96 well plate에 분주한 후 37℃, 2시간 incubation하였다. washing buffer로 washing하고 blocking buffer를 넣어 37℃, 1시간 incubation하였다. washing buffer로 다시 washing, sample을 분주하고 37℃, 1시간 incubation하였다. washing buffer로 washing 후, TMB를 분주하고 10~15분간 incubation한 후에 ELISA reader로 450 ㎚에서 측정하였다.

7. 통계학적 분석

본 연구의 실험결과는 mean±SD로 나타냈으며, 각 그룹간의 통계처리는 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 백내장 발병 변화

Streptozotocin 주사에 의한 당뇨 및 당뇨병성 백내장의 발병 변화는 Fig. 1에 나타내었다. Streptozotocin 주사 4주후 당뇨병성 백내장이 안구 전반부에 확장되었으며, 시간이 경과 할수록 백내장의 증세가 더욱 심화되는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에 사용된 rat는 당뇨병 및 당뇨병성 백내장 유발 모델로써 적절한 것으로 나타났다.

2. 체중, 장기무게 및 혈당량의 변화

I&H®의 섭취가 rat의 체중변화와 비장 (Spleen)과 간 (Liver)의 무게에 미치는 영향을 Table 2, 3에 나타내었다. rat의 체중은 사육기간의 경과에 따라 모든 실험군에서 다소 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 STZ + I&H®군, I&H®군 다

Table 2. The change of body weight from rat fed I&H® induced STZ.

	0 week (g)	3 weeks (g)	6 weeks (g)	9 weeks (g)	12 weeks (g)
Control	173.4±2.1[a]	341.6±6.5[a]	451.1±11.4[a]	524.3±13.3[a]	570.3±14.1[a*]
STZ	173.5±3.2[a]	167.4±6.1[b]	195.4±12.7[b]	208.2±25.7[b]	216.7±37.1[b]
STZ + I&H®	172.8±2.2[b]	176.8±5.9[b]	1910.0±7.9[b]	211.1±6.4[b]	238.0±16.3[b]
I&H®	172.6±2.0[b]	341.4±6.9[a]	447.1±12.7[a]	517.1±14.2[a]	564.9±15.4[a]

Control - Normal diet group; STZ - Streptozotocin (STZ) treated group; STZ + I&H® - Streptozotocin (STZ) treated group + I&H® diet group; I&H® - I&H® diet group. *Means with different superscript in the same row significantly differ at $P < 0.05$.

Table 3. The change of organ weight from rat fed I&H® induced STZ.

	Liver (g)	Spleen (g)
Control	14.67±3.78[a]	0.72±0.28[a*]
STZ	10.83±3.75[b]	0.29±0.15[c]
STZ + I&H®	11.17±1.63[ab]	0.37±0.13[b]
I&H®	13.96±4.60[a]	0.72±0.21[a]

Control - Normal diet group; STZ - Streptozotocin (STZ) treated group; STZ + I&H® - Streptozotocin (STZ) treated group + I&H® diet group; I&H® - I&H® diet group. *Means with different superscript in the same row significantly differ at $P < 0.05$.

른 실험군에 비교해 체중의 증가량이 낮게 나타났다. 장기무게의 경우 Spleen과 Liver 모두 STZ군에서 유의적으로 낮게 나타났으며, 대조군과 I&H®군에서는 Spleen과 Liver의 무게가 유의적으로 높게 나타났다. 이로 인해 I&H®의 섭취가 당뇨로 인한 체중의 변화를 완화시켜주는 결과를 확인할 수 있었다.

3. Immunoblotting을 통한 Inflammatory cytokine 측정

가장 주요한 Inflammatory cytokine의 하나인 tumor necrosis factor-α (TNF-α) protein의 발현은 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험에서 liver, spleen 그리고 lens 조직에서, TNF-α protein의 발현율은 STZ군에서 높게 나타났으며, STZ + I&H®군에서는 TNF-α protein의 발현이 낮게 나타났다. TNF-α는 염증 작용에 관여하는 중요한 cytokine으로 활성화된 대식세포 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 종양세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개물질로 알려져 있다. 따라서 추출혼합물 (I&H®)의 급여는 TNF-α protein의 발현을 억제하고 이로 인해 염증을 억제하는 역할을 할 수 있을 것이다.

4. Immunoblotting을 통한 cytokine 발현 측정

당대사와 관련한 cytokine을 JAK/STAT 신호전달 과정과 관련하여 조사하였으며, 관련 cytokine의 발현은 Fig. 3에 나타내었다. 본 실험에서 당대사와 관련 있는 IL-6, STAT3 cytokine은 STZ군에서 뚜렷한 발현양상을 보였다. 그러나, STZ + I&H®군은 STZ군보다 IL-6, STAT3 cytokine의 발현이

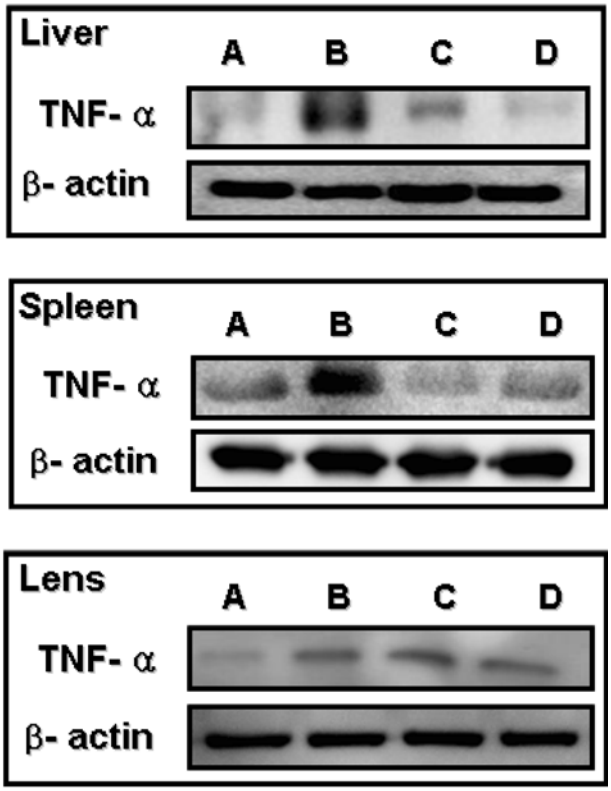

Fig. 2. Expression of TNF-α protein by western blotting in the liver, spleen and lens. Actin was used as on internal control. (A) Normal diet group; (B) Streptozotocin (STZ) treated group; (C) Streptozotocin (STZ) treated group + I&H® diet group; (D) I&H® diet group.

줄어들었고, 또한 JAK/STAT을 매개한 cytokine 발현에서 역시 STZ군에 비해 STZ + I&H®군에서 발현이 줄어드는 것으로 나타났다. STAT3는 IL-6에 의해 유발된 신호전달의 중요한 매개체이다. STAT3가 당신생에 관련된 유전자들의 발현을 정상화 시키고 대사 장애도 교정시켜주는 결과가 보고되어 당뇨와 관련된 대사 이상에 STAT3의 발현이 새로운 당뇨병 치료제의 개발에 대한 모델로 대두되고 있다 (Alonzi *et al*., 2001; Takeda *et al*., 1997; Levy and Lee, 2002; Gong *et al*., 2005). IL-6의 생성은 TNF-α나 IL-1β 같은 요인 외에도 lipopolysaccharide에 의해 유도되며, 염증유도 cytokine 으로서

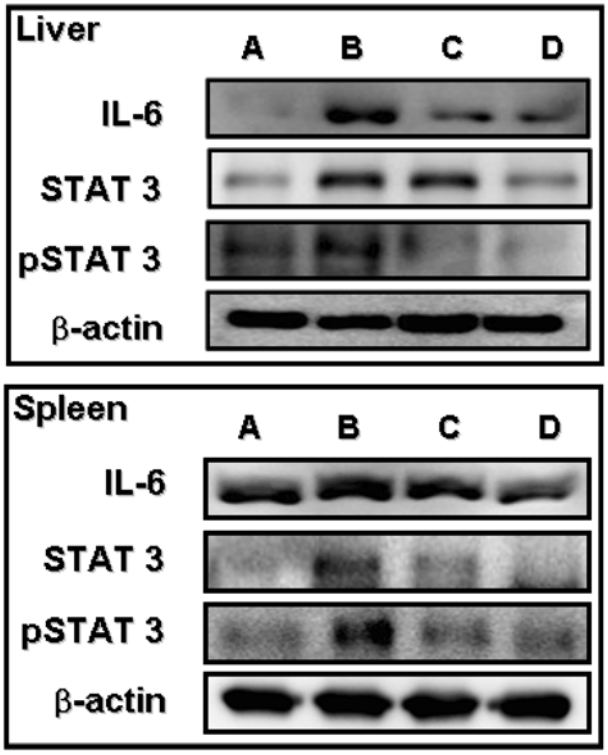

Fig. 3. Expression of IL-6, STAT3, pSTAT3 protein by western blotting in the liver and spleen. specific anti IL-6, STAT3, pSTAT3 antibodies. Actin was used as on internal control. (A) Normal diet group; (B) Streptozotocin (STZ) treated group; (C) Streptozotocin(STZ) treated group + c diet group; (D) I&H® diet group.

내인성 발열인자 (pyrogen) 및 inflammatory cytokine로 작용하며 면역 체계와 조혈 등에 다양한 영향을 미친다. (Willeaume *et al*., 1995; Van Snick, 1990). Fig. 3에서와 같이 STZ + I&H®봇 【¦ IL-6와 STAT3발현이 낮춰진 것으로 보아 추출혼합물 (I&H®)의 급여로 인해 당뇨병 관련 cytokine의 발현을 줄여 당뇨병 치료에 영향을 줄 수 있는 것으로 나타났다. 또한 기존의 연구결과와 본 연구결과에 착안한 cytokine의 면역 조절로 인하여 당뇨병 및 당뇨 합병증 예방에 기여를 할 수 있을 것이라 사료된다.

5. ELISA을 이용한 Immunoglobulin E 항체 측정

당뇨를 유발시킨 rat의 각막에서 IgE 생성량을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. IgE 생성량은 control군보다 STZ군이 높게 나타났고, STZ + I&H®군에 비교해 I&H® 군에서 IgE의 생성량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 STZ군과 I&H® 혼합 추출물을 먹인 군에서 비교해 볼 때 IgE의 생성량이 감소하는 것으로 보아 I&H® 의 급여가 B 림프구에서 분화하는 IgE의 감소에 영향을 주어 염증 관련 당뇨 질환 예방에 중요한 역할을 할 것이라 생각된다.

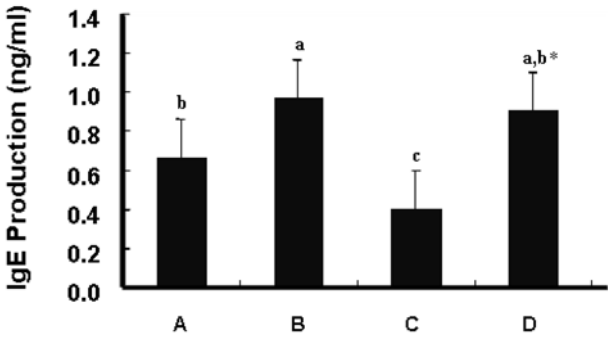

Fig. 4. Immunoglobulin E production from lens in culture supernatant by ELISA (n = 7 for each group). The values are the mean ± S.D. of three independent experiments. (A) Normal diet group; (B) Streptozotocin (STZ) treated group; (C) Streptozotocin(STZ) treated group + I&H® diet group; (D) I&H® diet group. *Means with different superscript in the same row significantly differ at $P < 0.05$.

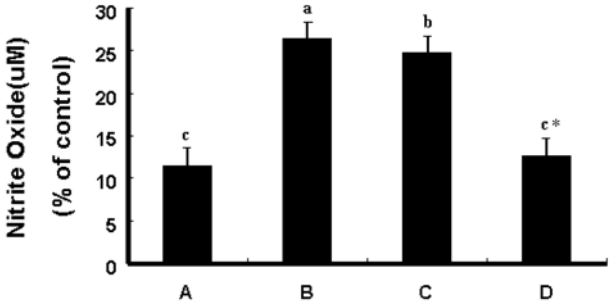

Fig. 5. Nitric oxide production from lens in culture supernatant by Griess reagent (n = 7 for each group). The values are the mean ± S.D. of three independent experiments. (A) Normal diet group; (B) Streptozotocin (STZ) treated group; (C) Streptozotocin (STZ) treated group + I&H diet group; (D) I&H diet group. *Means with different superscript in the same row significantly differ at $P < 0.05$.

6. Nitric oxide(NO) 생산량 측정

I&H®의 급여가 망막병증과 관련하여 혈관신생에 필수적인 요소인 Nitric oxide(NO)의 생성량에 미치는 효과를 Fig. 5에 나타내었다. Griess reagent로 실험한 결과 NO 생성량은 control군보다 STZ군이 높게 나타났고, STZ + I&H®군에서는 NO의 생성량이 STZ 군에 비해 줄어든 것으로 나타났다. iNOS에 의한 NO 생성이 많으면 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다. 일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO 형성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다 (Stuehr *et al*., 1991; McCartney-Francis *et al*., 1993; Weisz *et al*., 1996). 또한, NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데,

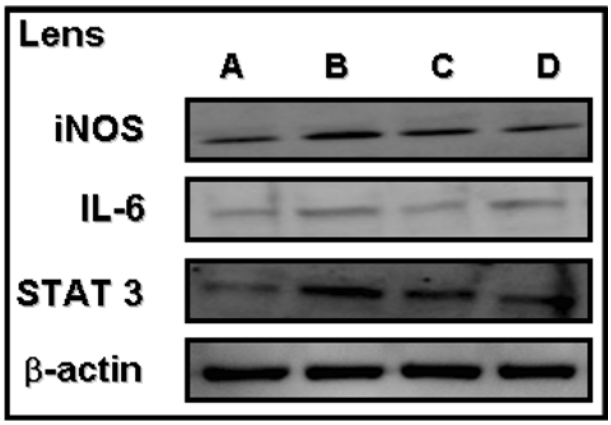

Fig. 6. Expression of iNOS, IL-6, STAT3 protein by western blotting in the lens. Actin was used as on internal control. (A) Normal diet group; (B) Streptozotocin (STZ) treated group; (C) Streptozotocin (STZ) treated group + I&H diet group; (D) I&H diet group.

iNOS의 발현이 증가하여 NO의 생성량이 증가하게 되면, 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-6 등의 염증성 사이토카인을 생산하며 궁극적으로 여러 가지 면역반응, 특히 염증반응에 관여 한다. 본 연구에서 NO의 생성량은 I&H®의 급여로 인해 유의적으로 감소하는 것으로 나타나 염증반응과 관련된 cytokine의 생성을 억제하여 당뇨병과 관련된 염증반응을 줄여 줄 수 있는 것으로 나타났다.

7. 망막병증 조절

I&H®의 급여가 망막병증과 관련한 cytokine 발현량에 미치는 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 혈관내피성장인자와 관련된 STAT3의 발현에서, STAT3와 STAT3의 상위조절인자인 IL-6 cytokine 역시 I&H®을 투여하였을 때 STZ 군보다 억제효과를 확인할 수 있었다. 또한 iNOS에서 합성된 NO의 생성량 역시 I&H®군에서 적은 것을 확인할 수 있었으며, iNOS의 발현량도 같은 결과를 보여주었다. 당뇨로 인한 합병증 중 하나인 당뇨망막병증은 성인 실명의 가장 큰 원인이다. 당뇨망막병증은 신생혈관의 형성으로 인하여 유리체 출혈, 망막박리, 신생혈관 녹내장 등 다양한 합병증이 발생하여 실명에 이르게 되는 질환이다. 망막의 혈관 신생은 망막의 하혈성 손상으로 인해 국소적인 혈관신생인자가 분비되어 발생하게 되는데, 이러한 혈관신생은 복잡한 다단계의 과정을 거치고 다양한 cytokine과 성장인자들이 관여하게 된다 (Bussolio *et al*., 1997; Casey and Li, 1997; Kim *et al*., 2009; Holtkamp *et al.,* 2001). 위의 실험 결과에서 볼 때 STZ로 유발된 당뇨 동물 모델에서 I&H®의 투여가 spleen과 liver에서 염증성 cytokine인 TNF-α와, JAK/STAT pathway를 경유한 IL-6와 STAT3의 발현을 억제하였음을 확인할 수 있었다.

따라서, 상기 실험결과로부터 본 추출혼합물은 혈당뿐만 아니라 당뇨와 관련된 cytokine인 IL-6의 발현을 유의적으로 조절하고, 망막병증에 관련된 STAT3의 발현도 조절함으로써, 당뇨병 또는 당뇨 합병증인 눈 질환 예방에 긍정적인 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 당뇨병과 당뇨 합병증으로 가는 단계 중 염증 조절에서도 효과가 있음을 확인하여 이는 향후 I&H®가 당뇨병 및 당뇨 합병증관련 질환 예방 및 치료에 효과적으로 기여할 수 있을 것이라 사료됨을 의미한다. 그러나, 망막병증과 당뇨병이 정확히 어떠한 경로로 관련된 cytokine에 영향을 미치는지에 관해서는 좀 더 추가적인 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업 (건국대학교 바이오식 · 의약 연구센터), 건국대학교 의료생명대학 일반대학원 응용생명과학과 두뇌한국사업팀의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C and Poli V. (2001). Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. Molecular Biology of the Cell. 21:1621-1632.

Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Markiewicz W, Avizohar O, Brook GJ and Levy Y. (2004). Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. 28:674-679.

Boulton M, Gregor Z, McLeod D, Charteris D and Jarvis-Evans J. (1997). Intravitreal growth factors in proliferative diabetic retinopathy: Correlation with neovascular activity and glycaemic man-agement. The British Journal of Ophthalmology. 81:228-233.

Bussolio F, Mantovani A and Persico G. (1997). Molecular mechanisms of blood vessel formation. Trends in Biochemical Sciences. 22:251-256.

Casey R and Li WW. (1997). Factors controlling ocular angiogenesis. The American Journal of Ophthalmology. 124: 521-529.

Cho JH, Sin JS, Kim EJ, Shin SH, Jang JY, Shin KS, Kim YB, Kang JK and Hwang SY. (2004). Protective effect of *Lycii fructus* extract against hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride. Korean Journal of Laboratory Animal Science. 20:187-193.

Cho YJ and Bang MA. (2004). Hypoglycemic and antioxidative effects of dietary sea-tangle extracts supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. The Korean Nutrition Society. 37:5-14.

Choi JS, lee HJ and Kang SS. (1994). Alaternin, cassiaside and rubrofusarin gentiobioside, radical scavenging principles from the seed of *Cassia tora* on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Archives of Pharmacal Research. 17:462-469.

Choi JS, Lee HJ, Park KY, Ha JO and Kang SS. (1997). In vitro antimutagennic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. Planta Medica. 63:11-14.

Gong W, Wang L and Yao JC. (2005). Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predicts expression of vascular endothelial growth factor in and angiogenic phenotype of human gastric cancer. Clinical Cancer Research. 11:1386-1393.

Guha M, Bai W, Nadler J.L and Natarajan R. (2000). Molecularn mechanism of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress dependent and independent pathways. Journal of Biological Chemistry. 275:17728-17739.

Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R and de Vos AF. (2001). Retinal pigment epithelium-immune system interactions. cytokine production and cytokine-induced changes. Progress in Retinal and Eye Research. 20:29-48.

Kang KI, Jung JY, Koh KH and Lee CH. (2006). Hepatoprotective effects of *Lycii chinense* Mill fruit extracts and fresh fruit juice. Korean Journal of food Science and Technology. 38:99-103.

Kim JW, Ham DS, Park HS, Ahn YB, Song KH, Yoon KH, Yoo KD, Kim MJ, Jeong IK and Ko SH. (2009). Effects of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) on pancreatic islets in mouse model of type 2 diabetes mellitus. Korean Diabetes Journal. 33:185-197.

Lee DH, Park WJ, Lee BC, Lee JC, Lee DH and Lee JS. (2005). Manufacture and physiological functionality of korean traditional wine by using gugija (*Lycii fructus*). Korean Journal of food Science and Technology. 37:789-794.

Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY and Lee HY. (2003). Screening of biological activities of the extracts from *Rubi fructus*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 11:5-12.

Lee TB. (1985) Illustrate flora of korea. Hangmoonsa.

Levy DE and Lee CK. (2002). What does Stat3 do? The Journal of Clinical Investigation. 109:1143-1148.

Lim SJ, Kim SY and Lee JW. (1995). The effects of korean wild vegetables on blood glucose levels and liver-muscle metabolism of streptozotocin-induced diabetic rats. Korean Journal of Nutrition. 28:585-594.

Lim SJ and Kim GJ. (1995). Hypoglycemic effect of *Polygonatum odoratum* var. Puriflorum ohwi extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Korean Journal of Nutrition. 28:727-736.

Lin Y, Rajala MW, Berger JP, Moller DE, Barzilai N and Scherer PE. (2001). Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. Journal of Biological Chemistry. 276:42077-83.

McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl SM. (1993). Suppression of arthritis by an inhibitor of nitic oxide synthase. The Journal of Experimental Medicine. 178: 749-754.

Moller DE. (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Nature. 414:821-827.

Park BH, Cho HS and Kim DH. (2005). Antioxidative effect of solvent extracts of *Lycii fructus* Powder(LFP) and Maejakgwa made with LFP. The korean Society of food Science and Nutrition. 34(9):1314-1319.

Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK and Lee HY. (2004). Effects of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* stapf and *Rubus coreanus* Miq. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 19:113-117.

Park JS, Lee DJ and Choi KJ. (2000). Effects of extracts from various parts of *Lycium chinensis* Mill on proliferation of mouse spleen cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 8:291-296.

Park WJ, Lee BC, Lee JC, Lee EN, Song JE, Lee DH and Lee JS. (2007). Cardiovascular biofunctional activity acd antioxidant activity of gugija (*Lycium chinensis* Mill) species and its hybrids. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:391-397.

Pfeiffer A, Spranger J, Meyer-Schwickerath R and Schtz H. (1997). Growth factor alterations in advanced diabetic retinapathy: a posssible role of blood retina barrier breakdown. Diabetes. 46(Supplement). 2:S26-S30.

Stuehr H H J, Kwon N S, Weise M and Nathan C. (1991). Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN- containing flavoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88:7773-7777.

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T and Akira S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94:3801-3804.

The Compilation Committee on Teaching Materials of Oriental Medicine College. (2007). Botany. Younglimsa.

Van Snick J. (1990). IL-6: an overview. Annual Review of Immunology. 8: 253-278.

Weisz A, Cicatiello I and Esumi H. (1996). Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterical lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginene. The Journal of Biochemistry. 316: 209-215.

Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T and Huez G. (1995). Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. Journal of Inflammation. 46:1-12.