

消平湯이 RIN-m5F 세포에서 인슐린 분비 및 유전자 발현에 미치는 영향

윤성식, 조충식
대전대학교대학원 한의학과 내과학교실

Effect of *Sopyung-tang* Extract on Insulin Secretion and Gene Expression in RIN-m5F Cells

Sung-sik Youn, Chung-sik Cho
Dept. of Oriental Medicine Graduate school, Dae-Jeon University

ABSTRACT

Background : At high glucose levels in β -cells, cell viability and insulin secretion are decreased by glucotoxicity. *Sopyung-tang*(SPT) had an effect on blood glucose level decrease and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats.

Objectives : This study performed a series of experiment to verify the effects of SPT extract on the cell viability, antioxidant enzyme activities, insulin secretion and insulin mRNA expression at hyperglycemic states of RIN-m5F.

Methods : After treatment at various concentrations of SPT added to the RIN-m5F cells, cell viability by MTT assay, free radical-scavenging activity, SOD activity and insulin secretion were measured. Additionally, insulin-related gene expression was measured using real-time RT-PCR.

Results : Compared to the control group, SPT extract showed considerable effects on RIN-m5F cell viability, DPPH radical-scavenging activity, superoxide dismutase (SOD) activity, insulin secretion and insulin-related gene expression.

Conclusions : This study showed that SPT extract has an effect on β -cell cell viability, insulin secretion and insulin-related gene expression. Thus, SPT extract may be used for treatment of diabetes and its complications. Further mechanism studies of SPT seem to be necessary on the glucotoxicity and oxidative stress.

Key words : Glucotoxicity, *Sopyung-tang*(SPT), RIN-m5F, Insulin secretion, Gene expression

1. 서론

당뇨병은 포도당의 세포 내 흡수에 관여하는 호르몬인 인슐린이 정상적으로 분비되지 못하거나 조직에서의 인슐린에 대한 감수성 감소로 포도당

의 혈액 내 농도가 증가하여 고혈당 상태가 지속되는 만성 대사성 질환이다^{1,2}. 2008년 통계청의 발표에 따르면, 당뇨병으로 인한 사망인구는 10만 명당 20.7명으로 국내 사망원인 중 5위를 차지하였고, 40대의 경우 5.8명, 50대의 경우 17.2명, 60대의 경우 53.6명으로 연령에 따라 사망률이 증가하였다³.

당뇨병에서 나타나는 고혈당은 여러 기관의 구조적, 기능적 독성을 일으켜 당뇨병성 망막병증, 신병증, 신경병증, 대혈관 질환 등의 합병증을 유

· 교신저자: 조충식 충남 천안시 두정동 621번지
대전대학교 부속천안한방병원 신계내과
TEL: 041-521-7531 FAX: 041-521-7007
E-mail: cho0102@chol.com

발하고, 고혈당이 지속될수록 췌장 β-cell의 기능이 악화되어 인슐린의 분비가 줄어들게 된다⁴⁻⁶.

최근 당뇨병 동물모델과 당뇨병 환자에서 고혈당으로 인한 대사이상으로 reactive oxygen species (ROS)가 증가되는 것으로 밝혀졌고⁷⁻⁹, oxidative stress가 당뇨병에서 혈관합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다¹⁰. 또한, 인슐린 분비 감소는 췌장 β-cell의 양과 밀접한 관련이 있고, 이러한 β-cell의 apoptosis를 촉진하는 기전으로 고혈당에 의한 당독성^{11,12}, 지방산에 의한 지질독성^{13,14}, ROS에 의한 oxidative stress 등이 알려져 있다¹⁵. 특히, oxidative stress는 당독성, 지질독성 등 여러 가지 자극들의 마지막 단계로 직간접적으로 β-cell의 apoptosis와 관련되고, 인슐린 저항성을 유발함이 밝혀져 최근 주목받고 있다¹⁶.

최근 한의학에서도 oxidative stress에 대한 췌장 β-cell 보호효과에 관심이 증대되어 각 본초들의 항산화작용 비교연구¹⁷, 당뇨 백서에서의 항산화작용에 대한 연구¹⁸⁻²¹, 포도당 독성에 대한 RIN-m5F 세포의 인슐린 분비와 α-glucosidase 활성 억제에 미치는 영향에 대한 연구²² 등이 이루어지고 있다.

본 연구에 사용된 消平湯은 이미 streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 췌장 β-cell 활성 및 항산화 효소활성에 작용하여 고혈당으로 인한 oxidative stress 생성을 감소시키는 것으로 밝혀졌다²³. 하지만 아직까지 消平湯이 인슐린 분비 및 유전자 발현에 미치는 효과에 대한 연구는 밝혀지지 않았다.

이에 저자는 消平湯이 포도당 독성에 대한 RIN-m5F 세포 보호와 인슐린 분비 및 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 消平湯(*Sopyung-tang*, SPT)

의 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같으며 사용한 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Sopyung-tang*(SPT)

| Herb | Galenical name | Amount (g) |
|--------------|--|------------|
| 蒼朮 | <i>Rhizoma of Atractylodes japonica</i> KOIDZ. | 8 |
| 牡丹皮 | <i>Cortex of Paeonia suffruticosa</i> ANDR. | 6 |
| 白朮 | <i>Radix of Atractylodes macrocephal</i> KOIDZ. | 6 |
| 陳皮 | <i>Pericarpium of Citrus unshiu</i> MARKOVICH | 6 |
| 當歸 | <i>Radix of Angelica gigas</i> NAKAI | 4 |
| 赤芍藥 | <i>Radix of Paeonia lactiflora</i> PALL. | 4 |
| 桃仁 | <i>Semen of Prunus Persica(L.)</i> BATSCH | 4 |
| 厚朴 | <i>Cortex of Magnolia officinalis</i> REHD. et WILS. | 4 |
| 甘草 | <i>Radix of Glycyrrhizae uralensis</i> FISCH. | 4 |
| 梔子 | <i>Fructus of Gardenia jasminoides</i> for. <i>grandiflora</i> MAKINO. | 3 |
| 黃芩 | <i>Radix of Scutellaria baicalensis</i> GEORGI. | 3 |
| 貝母 | <i>Bulbus of Fritillaria cirrhosa</i> D.DON. | 4 |
| 桔梗 | <i>Radix of Platycodon grandiflorum</i> (JACQ.) A. DC. | 4 |
| 青皮 | <i>Viride Pericarpium of Citri reticulata</i> BLANCO. | 4 |
| 車前子 | <i>Semen of Plantago asiatica</i> L. | 4 |
| Total amount | | 68(g) |

2) 시약 및 세포주

Cell culture는 FBS(Gibco-BRL, Grand Island, U.S.A.), RPMI1640(Gibco-BRL, Grand Island, U.S.A.), 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 50µM 2-mercaptoethanol, D-PBS

dulbecco's phosphate buffered saline(GIBCO BRL Life Technology, Grand Island, U.S.A.), potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, trypsin-EDTA(GIBCO BRL, U.S.A.), p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside, PIPES buffer (0.1M, pH 6.8), alpha-glucosidase, isopropanol 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), NaOH, Dimethyl Sulfoxide(DMSO), isopropyl alcohol은 Sigma(U.S.A.) 제품을 사용하였고, trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD), Superscript II reverse transcriptase(Life Technologies, Gaithersburg, MD), iQ SYBR green supermix(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. Rat insulin radioimmunoassay (RIA) kit(Linco Research, Inc., St. Charles, MO)는 Acetonitrile(Merck사, HPLC용)을 사용하였다. RIN-m5F 췌장 β -cell 유래 세포주는 ATCC (Manassas, VA)에서 구입하였다.

3) 기 기

본 실험에는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.), C18 역상 HPLC column(Hypersil, U.S.A.), HPLC (Shimadzu, Japan)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

SPT 68g을 증류수 1,000ml에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotay vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 7.6g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고(-20°C)에 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 phosphate buffer에 희석 후, 0.22 μ m 필터링하여 사용하였다.

2) SPT의 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

SPT의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C18역상 HPLC column을 장착한 HPLC를 사용하였다. 전체 분석시간은 30분으로 이동상의 구성은 초기 5분 동안 H₂O를 흘려주었고, 이후 20분 동안은 acetonitrile gradient를 하여 acetonitrile을 100%까지 올렸으며, 그 상태를 5분간 지속하였다. 214nm에서의 흡광도를 측정하여 시료의 양을 확인하였다.

3) RIN-m5F 세포의 배양

췌장 β -cell 유래 세포주인 RIN-m5F 세포는 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 RPMI 1640 Media에서 5% CO₂-95% air, 37°C에서 배양하였다. 배양액은 3~4일 간격으로 교대하였고 세포들은 trypsin-EDTA를 사용하여 떼어낸 후 계대배양하였다.

4) MTT를 이용한 세포 증식 측정

배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA를 사용하여 분리한 후, PBS으로 3회 세척한 다음, 96-multiwell에 2 \times 10⁴cells/well의 세포수가 되도록 산정하여 사용하였다. 세포는 FBS가 들어있는 RPMI배양액에서 SPT를 각각 다양한 농도(2, 4, 6, 8, 12 μ g/ml)로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 이후 50 μ g/ml MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]를 처리하여 반응시킨 다음 microplate reader로 570nm에서 측정하였다.

5) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) free radical

-scavenging 활성 측정

SPT의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로, SPT를 phosphate buffer에 녹여 다양한 농도(0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 100 μl 에 200mM DPPH 900 μl 를 섞고 상온에서 10분간 방치 후, eppendorf tube에서 96-well plate의 각 well에 분주하여 O.D 517mm에서 측정하였다.(Blank : phosphate buffer, Control : phosphate buffer+DPPH)

Free radical scavenging activity (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{Absorbance of test compound}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

6) SOD(superoxide dismutases) 활성 측정 실험
96-well plate의 각 well에 다양한 농도(0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 SPT 20 μl 를 첨가한 후 Reagent solution 200 μl 를 넣고 마지막으로 Enzyme working solution을 넣어준 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 반응시킨다. ELISA reader를 이용하여 O.D 450mm에서 측정하여, SOD activity(inhibition rate, %)를 계산하였다. SOD 활성을 측정하는 nitrobutyltetrazolium(NBT)을 이용한 method는 formazan dye의 물에 대한 난용성과 환원된 xanthine oxidase와의 상호작용하는 단점을 가지고 있다. 그래서 본 연구에서는 tetrazolium salt를 이용하여 SOD에 의한 환원으로 수용성의 WST-1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 형성하여 SOD activity를 측정하였으며, 측정은 SOD Assay kit(Dojindo, Japan)로 하였다.

7) RIN-m5F 세포에서 미치는 인슐린 분비 측정

RIN-m5F 세포를 well 당 3.0×10^5 개로 12-well plate에 분주하여 완전배지에서 3일간 배양한 후 SPT과 동일한 D-PBS를 첨가하여 1~2일간 배양하였다. SPT을 함유한 배지에서 배양한 후 modified Kreb's ringer bicarbonate 완충액(KRBB-HEPES, 134mmol/L NaCl, 4.8mmol/L KCl, 1mmol/L CaCl_2 , 1.2mmol/L MgSO_4 , 1.2mmol/L KH_2PO_4 , 5mmol/L NaHCO_3 , 10mmol/L HEPES,

1mg/ml BSA, pH 7.4)로 2회 세척하고 5mM, 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 바꾸어 1시간 배양한 후, 상층액을 취하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 분비된 인슐린의 양을 rat insulin RIA kit로 측정하였다. 각 well의 세포 단백질의 농도를 측정하여 각 단위 그램 단백질 당 인슐린 분비량을 계산하였다.

8) 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 인슐린 합성 측정

RIN-m5F 세포를 well 당 3.0×10^5 개로 6-well plate에 분주하여 5mM, 20mM의 포도당 배지와 SPT을 함유한 배지(6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 48시간 동안 배양하였다. KRBB-HEPES 완충액으로 2회 세척하고 1시간 동안 배양한 후, 각각 5mM, 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 배양한 다음 trizol로 총 RNA를 추출하였다. 세포에 1ml의 trizol 용액을 첨가한 후 실온에서 5분 동안 배양하고 trizol 용액 1ml당 0.2ml의 chloroform을 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 12,000 \times g로 원심 분리하였다. 상층부의 액상 부위를 새로운 튜브에 옮겨 담은 후 0.5ml의 isopropyl alcohol을 첨가하고 실온에서 15분간 배양하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 12,000 \times g로 다시 원심 분리하였다. Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻은 후 iQ SYBR green supermix를 이용하여 β -actin에 대한 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

각 유전자 발현 정도를 real-time RT-PCR을 이용해 측정하였다. 각각의 유전자들의 염기 서열은 Table 2와 같다. 각 sample의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix(Bio-Rad) 25 μl 와 각각의 유전자들과 10pM forward and reverse primers를 1 μl 씩 첨가하여 각각 50 μl 반응이 이루어졌으며 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 후 30초간 40cycle을 돌린 다음 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 동안 반응을 일으켰다. β -actin mRNA를 control로, target mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다.

Table 2. Sequences of Primer Set

| Primers | Forward | Reverse | T _m (°C) | Product size(bp) |
|---|---------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Beta-actin, (β-actin) | TCTGAACCCTAAGGCCAACCGTG | ATGGCATGAGGGAGCGCG | 60 | 198 |
| Insulin 1(INS1) | CAAACAGCACCTTTGTGGTCCCTCA | CACAATGCCACGCTTCTG | 60 | 199 |
| Insulin 2(INS2) | CAGCACCTTTGTGGTTCTCACTTG | ATCCACGATGCCGCGCTTC | 60 | 198 |
| Insulin receptor (Ins-R) | CCGAAAGCGAAGATCCCTTGAAG | ATGCCTGCAGCTCAATGC | 60 | 200 |
| Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) | AGAACGAGAAGAAGTGGCGGCAC | TGCAGCTGCAGAAGAGCC | 60 | 199 |
| Insulin receptor substrate 2 (IRS-2) | AGCGAGAAGAAGTGAAGAGCAAG | TGACCAAGTCGGTGAGTG | 60 | 199 |
| Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) | CCATCTGAGGAAGCAGAAGTCCCA | TGACGATCAGGTGGCGCT | 60 | 200 |
| Glucokinase (GCK) | ATTGGACCAAGGGCTTCAAGGC | CATTGCAGCCAGTGCCAC | 60 | 198 |
| Glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-R1) | CACTGCACCAGGAAGTACATCCAC | GCCGCCACGCAGTATTGCA | 60 | 200 |
| Glucagon-like peptide 2 receptor (GLP-R2) | CTTTGTGGGCACCAATCACTTGTG | TCCATTTGTGGCCCAGC | 60 | 200 |

9) 통계 분석

실험결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 통계적 처리는 Student t-test 또는 one-way ANOVA를 사용하였으며 P<0.05인 경우 통계적으로 의미있는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. SPT의 HPLC 분석 결과

C18역상 HPLC를 사용하여 SPT의 수용성 성분을 분석하였다. 역상 HPLC 분석 결과 앞부분의 수용 성분을 확인하였다(Fig. 1).

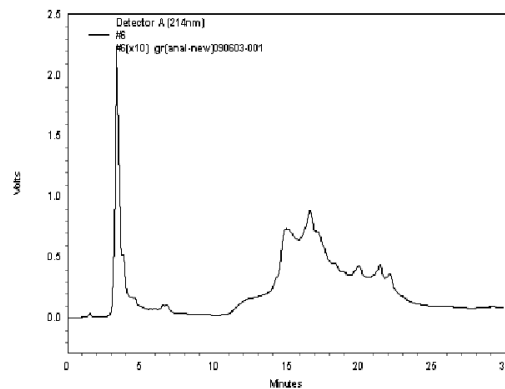


Fig. 1. Analysis of HPLC profile of SPT.

Water extracts were subjected to C18 column Chromatography on acetonitrile linear gradient (line) over a 30min period at a flow rate of 1ml /min. Absorbance was monitored at 214nm.

2. Cell viability에 미치는 영향

저농도 포도당(5mM) 처리군의 경우, SPT을 함유하지 않은 배지에서 RIN-m5F 세포를 배양한 군 (대조군)과 비교하여 SPT 2μg/ml에서 0.65±4.71%, SPT 6μg/ml에서 3.73±5.23%, SPT 12μg/ml에서

-2.18±1.03%로 세포 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

고농도 포도당(20mM) 처리군의 경우, SPT 2µg/ml에서 2.14±2.41%, SPT 6µg/ml에서 4.67±4.55%, SPT 12µg/ml에서 19.77±5.71%로 SPT 농도에 따라 세포 증식에 영향을 미치며, 대조군과 비교하여 유의한 결과가 있었다(Fig. 2).

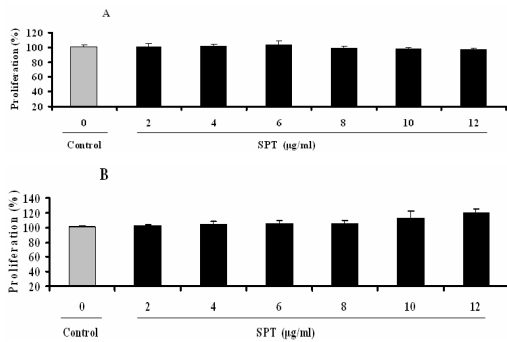


Fig. 2. Effects of SPT on proliferation.

Proliferation was determined after culturing 2×10^4 cells per well without(control) or with various concentration(2~12µg/ml) of SPT for 48hours using MTT assay. (A) Cells were cultured with 5mM glucose. (B) Cells were cultured with 20mM glucose. Data represent the mean±SD (n=3). (* : p<0.05)

저농도 포도당(5mM)에서 SPT(-)군은 0.55±2.97%, SPT(+)군은 -2.18±1.03%로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

고농도 포도당(20mM)에서 SPT(-)군은 -13.64±2.35%, SPT(+)군은 19.77±5.71%로 유의성 있게 증가하여 SPT가 고농도 포도당(20mM)에서 세포 증식에 영향을 주는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

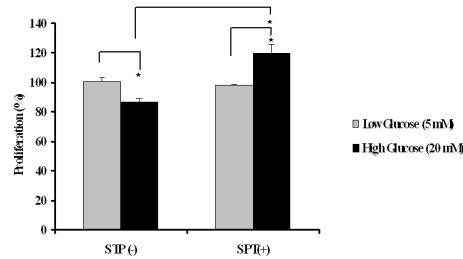


Fig. 3. Additional effects of SPT on proliferation of RIN-m5F cells determined by MTT assay.

Proliferation was determined after culturing 2×10^4 cells per well without or with 12µg/ml SPT for 48hours using MTT assay. (* : p<0.05)
SPT(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SPT.
SPT(+) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 12µg/ml SPT.

3. DPPH 라디칼 소거 작용에 대한 실험 결과

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응에서 SPT 은 농도 의존적 항산화 작용을 보였다(Table 3).

SPT의 DPPH 라디칼 소거 작용은 SPT 1µg/ml에서 5.29±3.18%, 10µg/ml에서 14.63±2.48%, 100µg/ml에서 21.46±2.54%로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 항산화능이 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effect of SPT on DPPH Radical-Scavenging Activity

| Sample | Concentration | Scavenging effect(%) |
|----------------------------|---------------|----------------------|
| SPT | 100 µg/ml | 21.46 ± 2.54* |
| | 10 µg/ml | 14.63 ± 2.48* |
| | 1 µg/ml | 5.29 ± 3.18* |
| | 0.1 µg/ml | 1.34 ± 4.61 |
| Negative control | 0 µg/ml | 0 |
| EAE (ethyl ascorbyl ether) | 1000 mM | 83.58 ± 0.20* |
| | 500 mM | 82.53 ± 0.14* |
| | 250 mM | 76.13 ± 0.29* |
| | 120 mM | 74.54 ± 0.58* |
| | 60 mM | 71.76 ± 0.20* |

Each value is mean±SD (n>3). (* : p<0.05)

Free radical scavenging activity (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{Absorbance of test compound}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

4. SOD 활성 측정에 대한 실험 결과

SPT 0.1 μ g/ml에서 15.05 \pm 0.24%, 1 μ g/ml에서 42.33 \pm 5.64%, 10 μ g/ml에서 73.62 \pm 1.36%, 100 μ g/ml에서 75.82 \pm 0.06%로 농도 의존적으로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4).

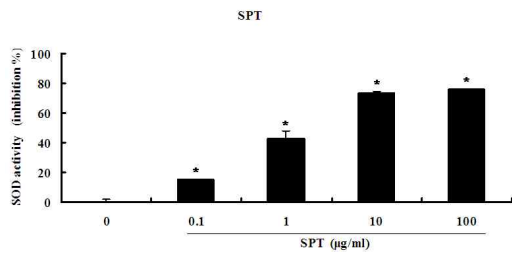


Fig. 4. Effect of SPT on the Superoxide dismutase (SOD) activity.

The effect of SPT on SOD activity was determined using BTB method. Data represent the mean \pm SD (n=3). (* : p<0.05)

5. 포도당 자극과 SPT에 의한 인슐린 분비에 미치는 영향

인슐린 분비량은 대조군의 경우, 저농도 포도당(5mM)에서 19.32 \pm 0.26ng/mg protein/1h이었고, 고농도 포도당(20mM)에서 13.00 \pm 0.11ng/mg protein/1h로 인슐린 분비량은 감소하였다(Fig. 5).

고농도 포도당(20mM)에서 SPT 6 μ g/ml에서 14.38 \pm 0.15ng/mg protein/1h, SPT 12 μ g/ml에서 17.65 \pm 0.42ng/mg protein/1h로 대조군에 비하여 인슐린 분비량의 유의성 있는 증가가 확인되었다(Fig. 5).

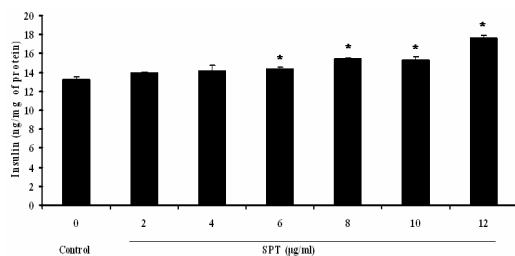


Fig. 5. Effect of SPT on glucose-stimulated insulin secretion(GSIS) in RIN-m5F cells.

Secretion was determined after culturing 3.0 \times 10⁵ cells per well without(control) or with various concentration(2~12 μ g/ml) of SPT for 48hours. Cells were cultured in KRBB-HEPES containing 20mM glucose for 1hours. Insulin amount was measured by rat insulin RIA kit. Data represent the mean \pm SD (n=3). (* : p<0.05)

6. SPT이 인슐린 분비 관련 유전자 발현에 미치는 영향

1) Insulin-1

INS-1 mRNA 발현은 대조군에서 0.44 \pm 0.04였고, SPT 6 μ g/ml에서 0.80 \pm 0.09, 12 μ g/ml에서 0.82 \pm 0.03로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6).

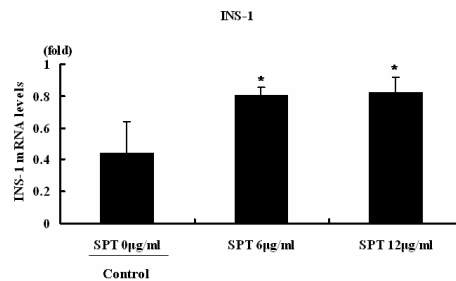


Fig. 6. Effect of SPT on INS-1 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration (6, 12 μ g/ml) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). (* : p<0.05)

2) Insulin-2

INS-2 mRNA 발현은 대조군에서 5.24 \pm 2.40였고, SPT 6 μ g/ml에서 0.80 \pm 0.09, 12 μ g/ml에서 0.82 \pm 0.03로 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

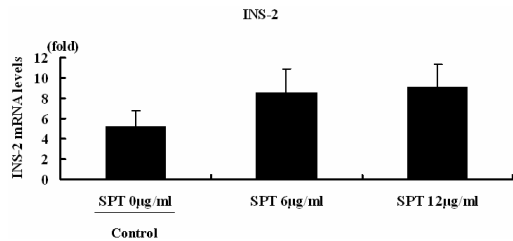


Fig. 7. Effect of SPT on INS-2 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration (6, 12µg/ml) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β-actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean±SD (n=3).

3) Insulin receptor substrate 1

IRS-1 mRNA 발현은 대조군에서 4.88±1.52였고, SPT 6µg/ml에서 13.09±0.06, 12µg/ml에서 14.64±0.89로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 8).

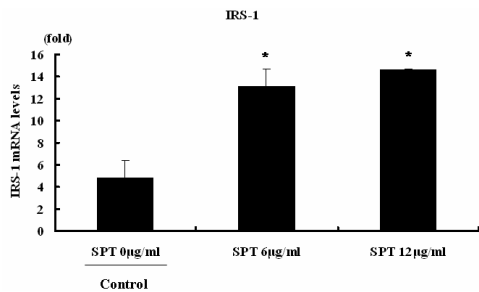


Fig. 8. Effect of SPT on IRS-1 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration (6, 12µg/ml) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β-actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean±SD (n=3). (* : p<0.05)

4) Insulin receptor substrate 2

IRS-2 mRNA 발현은 대조군에서 9.56±1.77였고, SPT 6µg/ml에서 43.65±16.29, 12µg/ml에서 45.04±1.89로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 9).

로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 9).

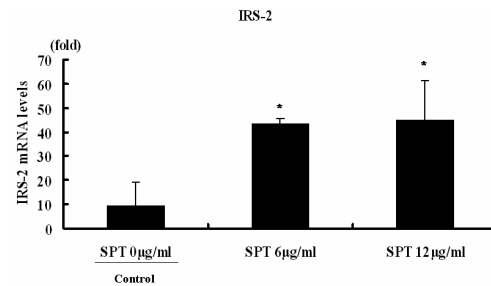


Fig. 9. Effect of SPT on IRS-2 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration (6, 12µg/ml) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β-actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean±SD (n=3). (* : p<0.05)

5) Insulin receptor substrate 3

IRS-3 mRNA 발현은 대조군에서 14.93±4.26였고, SPT 6µg/ml에서 23.80±7.01, 12µg/ml에서 27.65±8.15로 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

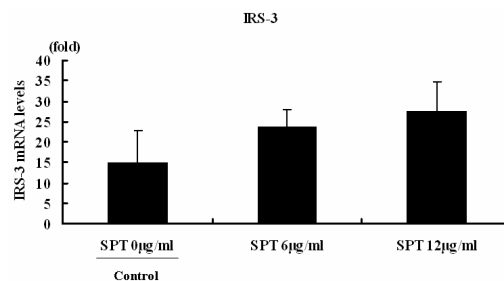


Fig. 10. Effect of SPT on IRS-3 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration(6, 12µg/ml) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β-actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean±SD (n=3).

6) Insulin receptor

Ins-R mRNA 발현은 대조군에서 0.046 ± 0.021 였고, SPT $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.017 ± 0.002 , $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.016 ± 0.065 로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 11).

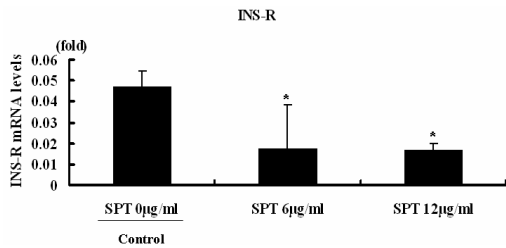


Fig. 11. Effect of SPT on Ins-R mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration($6, 12 \mu\text{g}/\text{ml}$) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). (* : p<0.05)

7) Glucokinase

GCK mRNA 발현은 대조군에서 0.027 ± 0.004 였고, SPT $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.028 ± 0.008 , $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.025 ± 0.001 로 대조군에 비하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 12).

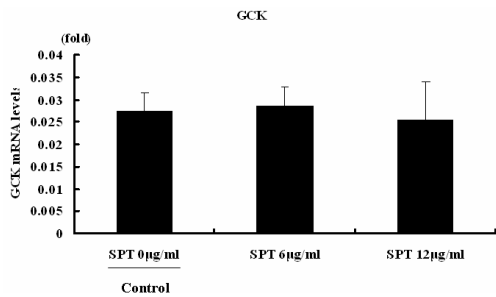


Fig. 12. Effect of SPT on GCK mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration($6, 12 \mu\text{g}/\text{ml}$) of SPT for 48 hours.

Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3).

8) Glucagon-like peptide 1 receptor

GLP-1R mRNA 발현은 대조군에서 0.0016 ± 0.0005 였고, SPT $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.0038 ± 0.0005 , $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.0042 ± 0.0015 로 대조군에 비하여 증가하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 13).

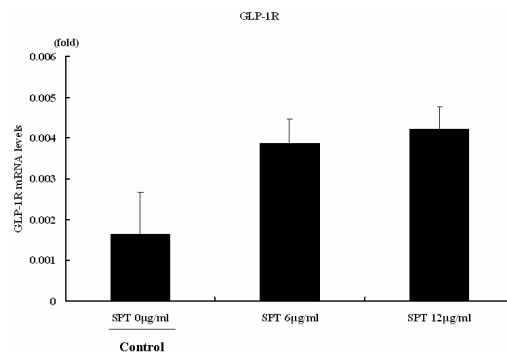


Fig. 13. Effect of SPT on GLP-1R mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration($6, 12 \mu\text{g}/\text{ml}$) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3).

9) Glucagon-like peptide 2 receptor

GLP-2R mRNA 발현은 대조군에서 0.041 ± 0.015 였고, SPT $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.0021 ± 0.0002 , $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.0032 ± 0.0050 로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 14).

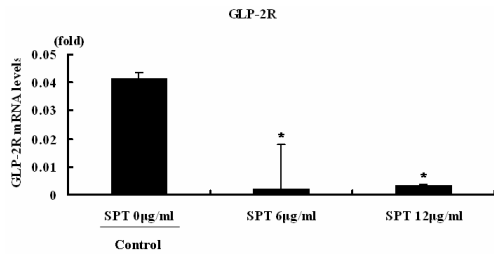


Fig. 14. Effect of SPT on GLP-2R mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate without(control) or with various concentration(6, 12µg/ml) of SPT for 48 hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β-actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean±SD (n=3). (* : p<0.05)

IV. 고찰

당뇨병은 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍에 의한 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환으로, 당뇨병에서 나타나는 대사 이상은 여러 장기들에 이차적인 병태생리적인 변화를 일으켜 급성 및 만성 합병증을 유발하고 사망률을 높인다²⁴. 당뇨병 환자에서 관상동맥 질환, 뇌혈관 질환, 말초혈관 질환 등으로 인한 사망률이 높은 것으로 알려져 있고, 고혈당이 이러한 혈관합병증과 직접적인 관계가 있기 때문에, 제1형 및 제2형 당뇨병 모두 정상에 가까운 혈당조절을 유도함으로써 합병증을 줄이고 사망률을 낮추는 것이 치료의 목표이다^{5,25}.

고혈당 상태에서는 포도당과 유리지방산이 근육 세포와 지방세포, 췌장 β-cell 및 다른 세포들에서 ROS 생성을 증가시키고, 세포내 항산화 기전이 저하되어 산화스트레스가 증가한다고 알려져 있다²⁶. 또한, 포도당 독성과 산화스트레스의 연관성에 대한 연구로는 당뇨병에서 포도당 산화로 인한 반응성 산소기의 생성 실험²⁷과 수산화 라디칼 제거인자가 고혈당으로 인한 단백질 분해를 보호한다는 보고⁹가 있었다.

고혈당에 의한 산화스트레스의 기전으로 포도당의 자가 산화, protein kinase C의 활성화, methylglyoxal 형성, glycation 형성, sorbitol 형성, 핵소아민 대사, 산화적 인산화 등이 있으며, 포도당 대사에 관여하는 대부분의 경로에서 ROS가 생성된다. ROS 생성 및 불충분한 제거로 야기된 산화스트레스가 혈관 내피, 신경, 신장 세포 및 췌장 β-cell에도 직접적인 손상을 준다^{6,28,29}. 특히 Grankvist 등³⁰은 췌장 세포에 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소가 다른 조직에 비해 적게 존재한다고 보고하여 췌장 세포의 산화스트레스 취약성을 제시하였다. 이밖에도 산화스트레스는 생체 내 만성적 염증을 일으켜 IRS-1 등 인슐린에 저항성을 유발하고^{31,32}, 혈액 내 최종당화산물(advanced glycation end products, AGE)을 형성하여 당뇨병성 혈관 합병증의 발생 및 죽상동맥경화증 발생에도 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다³³. 그러므로 Wolff SP 등³⁴⁻³⁶은 산화스트레스에 의한 세포 내 항산화 기전의 손상을 방지하고, 산화스트레스를 유발하는 oxygen free radical을 소거하는 약물이 당뇨병 치료에 필요하다고 하였다.

한의학에서 活血化癥의 효능은 생체 내에서 oxygen free radical들을 제어하는 항산화 작용과 유사한 관련성이 있어서 혈중 지질로 발생하는 동맥경화, 협심증, 심근경색에 효과가 있다고 알려져 있고³⁷, 이에 대해 當歸, 赤芍藥, 桃仁, 紅花, 丹蔘, 牡丹皮, 地龍, 水蛭 등의 약물이 활용되고 있다³⁸⁻⁴⁰.

한편, 이 등^{41,42}은 消渴에서 醇酒厚味, 營養過剩으로 인한 濕熱의 증상이 발생하며, 濕熱로 인해 陰虛燥熱, 氣陰兩虛 등의 양상이 나타난다고 하여 濕熱을 치료하는 것이 중요하다고 하였다.

消平湯은 蒼朮, 牡丹皮, 白朮, 陳皮, 當歸, 赤芍藥, 桃仁, 梔子, 黃芩, 桔梗, 貝母, 甘草, 車前子로 구성되어 대전대학교 부속한방병원에서 活血化癥와 祛濕清熱을 목적으로 당뇨병 및 당뇨병합병증에 활용하는 처방이며, 최²³는 消平湯이 streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 혈당 및 항산화효소 활성에

미치는 영향에서 消平湯의 투여가 대조군에 비해 당뇨쥐의 체중과 생존율이 증가하였으며, 항산화 효소 활성 및 β -cell의 활성을 증가시키는 것으로 보고하였다.

이에 저자는 消平湯이 당뇨병에 미치는 영향을 보다 구체적으로 알아보기 위하여 췌장 β -cell 유래 세포주인 RIN-m5F에 消平湯을 각각 다른 농도로 배양하여 세포 증식, 항산화 효소 활성도, 인슐린 분비, 인슐린 분비 관련 유전자 발현을 측정하였다.

SPT 농도에 따른 저농도 포도당(5mM)군과 고농도 포도당(20mM)군으로 MTT assay를 실시하여 미토콘드리아 활성도를 통한 β -cell 증식 변화를 비교 측정하였으며, 항산화 효소 활성도는 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 작용과 SOD 활성을 통하여 측정하였다.

세포 증식의 경우, 2~12 μ g/ml 농도의 SPT 열수 추출물에서 배양한 RIN-m5F 세포에 저농도와 고농도 포도당을 각각 가한 후, MTT를 이용하여 세포 증식 정도를 비교 관찰하였다. 실험결과, 저농도 포도당군에서는 대조군에 비해 차이가 없었으나 고농도 포도당군에서는 6~12 μ g/ml에서 SPT의 농도에 비례하여 유의하게 세포 증식에 효과가 있었다. 이는 저농도 포도당 처리군에서는 유의한 변화가 없으나 췌장 β -cell이 만성적으로 고농도 포도당에 노출되었을 때 SPT의 투여가 β -cell 손상을 방지하는 세포 보호효과가 있는 것으로 사료된다. 이는 최²³의 연구에서 SPT의 투여로 대조군에 비해 실험군에서 β -cell내 많은 수의 과립에서 β -cell의 면역 반응이 유의성 있게 증가된 실험결과와 일치하였다.

항산화 작용을 알아보기 위한 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 작용과 SOD 활성을 측정한 실험에서도 SPT의 농도에 비례하여 유의한 항산화 효과가 있었다. SPT 농도에 따른 항산화능의 증가는 SPT의 투여가 산화스트레스로 인한 췌장 β -cell 항산화 기전의 손상을 방지함으로써 당뇨병

치료에 도움이 될 것으로 생각된다.

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거능은 xanthine의 산화를 억제하는 기능을 말하며, xanthine은 prine체 대사산물로서 요산을 생성하는 반응의 촉매 과정에서 유리기를 생성하는 것으로 알려져 있다⁴³. SOD는 산화적 스트레스에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 효소로 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는데 관여한다^{44,45}. 최²³의 연구에서 GSH-px, CAT, GR, SOD는 대조군에 비해 실험군에서 모두 증가하였으며, 본 실험에서도 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 작용과 SOD 활성 결과 모두 SPT 농도 의존적으로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하여, 동물실험과 세포실험을 통하여 SPT의 항산화 효과가 밝혀졌다.

포도당 독성에 대한 β -cell의 인슐린 분비능을 알아보기 위해, 2~12 μ g/ml 농도로 처리한 SPT에 2일간 RIN-m5F 세포를 배양하고, 저농도 포도당과 고농도 포도당으로 처리한 후, GSIS를 측정하였다. 실험결과, SPT를 투여하지 않은 대조군에서는 저농도 포도당 처리군에 비하여 고농도 포도당 처리군에서 인슐린 분비량이 감소하였으며, 이것으로 포도당 독성이 β -cell에 손상을 주는 것을 확인할 수 있었다. 고농도 포도당 처리군에 SPT를 첨가배양 하였을 때 6~12 μ g/ml에서 SPT의 농도에 비례하여 인슐린 분비량의 유의성 있는 증가가 관찰되었다. SPT가 저농도 포도당 처리군에서보다 고농도 포도당 처리군에서 췌장 β -cell의 인슐린 분비기능을 촉진시켰음을 알 수 있었다.

따라서, SPT가 RIN-m5F 췌장 β -cell에 항산화 효소들을 활성화시켜 항산화 기전의 손상을 방지하고, 세포 증식 및 세포 보호와 포도당 자극 시 인슐린 분비에 모두 유의한 효과가 있는 것을 알 수 있었다. 최²³의 연구에서 SPT의 투여로 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨쥐에 체중 및 생존율이 증가하고 항산화 효소활성이 회복되어 고혈당을 감소시키는 결과와 일치하였다.

인슐린 관련 유전자 발현의 경우, SPT 투여군에

서 INS-1 mRNA는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, INS-2 mRNA 발현은 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. INS-1, INS-2 mRNA는 각각 insulin-1, insulin-2를 합성함으로써⁴⁶ SPT 투여가 인슐린 분비를 증가시키는 것을 알 수 있다.

SPT 투여군에서 IRS-1과 IRS-2 mRNA는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IRS-3 mRNA는 증가하였으나 유의성은 없었다. IRS는 인슐린 신호전달에 중요한 조절을 하는 매개체로 SPT 투여군에서는 대조군에 비해 IRS mRNA가 증가하여 인슐린 신호전달이 활성화되고 세포의 성장 및 대사작용을 돕는 것으로 사료된다.

SPT 투여군에서 Ins-R mRNA는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 이는 췌장 β -cell에서의 Ins-R mRNA 발현 감소를 의미한다. 추후 실제적으로 포도당 소비를 많이 하는 간조직이나 다른 골격근 등에서 포도당 독성과 SPT 투여의 Ins-R mRNA 발현에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

SPT 투여군에서 대조군에 비해 GCK mRNA는 유의한 차이가 없었다. GCK는 간과 췌장 β -cell에서 혈중 내 포도당을 인지하여 인슐린 분비를 조절하는 포도당 감지기구로 간에서 GCK가 활성화 되면 혈당은 에너지 생산을 위해 사용되거나 간에 글리코겐 형태로 저장되기 때문에 혈당이 감소하게 된다⁴⁷.

GLP-1R, GLP-2R mRNA는 GLP-1, GLP-2의 agonist로 SPT 투여군에서 GLP-1R는 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었고, GLP-2R는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. GLP-1은 식후 섭취한 영양소가 분해되기 시작할 때 혈당 상승에 반응하여 장내 내분비세포에서 분비되어 췌장의 β -cell을 자극하고 인슐린 분비를 촉진하게 된다⁴⁸. 또, 이미 췌장 β -cell에 생성 저장된 인슐린 외에도 GLP-1은 각종 인슐린 관련 전사인자들을 자극하여 인슐린 생합성을 촉진하며 β -cell의 증식을 유도하기도 한다⁴⁹. GLP-2는 GLP-1과 유사하

게 소장 분포하는 L-cell에서 생성되며, 장내세포의 포도당 운송과 영양분 흡수에 주로 작용하는 것으로 알려져 있다⁵⁰. GLP-1R, GLP-2R mRNA가 SPT 투여군에서 증가한 것은 장내세포에서 당의 흡수를 억제하여, 혈당강하에 효과적으로 작용할 가능성을 시사한다.

이상을 종합하면, SPT 투여는 고농도 포도당 자극에서 실험한 췌장 β -cell 유래 세포주인 RIN-m5F의 세포 증식 및 세포 보호, 항산화 효소 활성화, 인슐린 분비, 인슐린 분비 관련 유전자 발현에 우수한 효과가 있었다. 추후 SPT가 당뇨병 치료에 쓰일 수 있을 것으로 기대되며 이를 위해서는 SPT가 포도당 독성 및 산화스트레스로부터 β -cell의 손상을 방지하는 구체적인 기전과 임상적 연구가 필요하리라 사료된다. 또한, 식후 고혈당 조절에 유효하고 저혈당 유발없이 혈당을 낮추는 α -glucosidase 억제효과⁵¹에 대한 연구와 DNA chip을 이용한 당뇨 관련 pathway 연구도 필요하리라 사료된다.

V. 결론

消平湯 투여의 포도당 독성에 대한 췌장의 β -cell 세포 증식 및 세포 보호효과와 항산화 효소 활성화, 인슐린 분비 및 인슐린 관련 유전자 발현에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 消平湯은 대조군에 비하여 고농도 포도당 처리군에서 유의한 β -cell의 세포 보호효과가 있었으며, 농도 의존적으로 β -cell을 증가시켰다.
2. 消平湯은 대조군에 비하여 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거작용과 SOD 활성을 농도 의존적으로 유의성 있게 증가시켰다.
3. 消平湯은 대조군에 비하여 고농도 포도당 처리군에서 β -cell의 인슐린 분비를 유의성 있게 증가시켰다.
4. 消平湯은 대조군에 비하여 INS-1, INS-2의 유전자 발현을 증가시켰고, 통계적 유의성은

INS-1에서 나타났다.

5. 消平湯은 대조군에 비하여 IRS-1, IRS-2, IRS-3의 유전자 발현을 증가시켰고, 통계적 유의성은 IRS-1, IRS-2에서 나타났다.
6. 消平湯은 대조군에 비하여 Ins-R의 유전자 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
7. 消平湯은 대조군에 비하여 GLP-1R, GLP-2R의 유전자 발현을 증가시켰고, 통계적 유의성은 GLP-2R에서 나타났다.

이상의 결과로, 消平湯 투여는 고농도 포도당 자극에서 실험한 췌장의 β -cell 유래 세포주인 RIN-m5F 세포 증식 및 보호, 항산화 효소 활성화, 인슐린 분비, 인슐린 분비 관련 유전자 발현에 우수한 효과가 있었으며, 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 두호경. 동의신계학. 서울: 동양의학연구원; 1993, p. 1173-8.
2. C. Guyton, John E. Hall. Text book of medical physiology. W.B. Saunders; 2002, p. 1033-48.
3. 통계청. 2008년 사망 및 사망원인통계결과. 2009. Available at http://epic.kdi.re.kr/epic/epic_view.jsp?num=102999&me
4. Steiner G. Diabetes and atherosclerosis: an overview. Diabetes. 1981;30(Suppl 2):1-7.
5. The diabetes control and complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus. N ENG J Med 1993;329:977-86.
6. Robertson RP: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. J Biol Chem 2004;279:42351-4.
7. Nourooz-Zadeh J, Tauaddini-Surmadi J, McCathy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. Diabetes 1995;44:1054-8.
8. Frustaci A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. Circ Res 2000;87:1123-32.
9. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP; Hydroxy radical production and autoxidative glycosylation: glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. Biochem J 1988;256:205-12.
10. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautlar JL, Stern D: Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesion. Arterioscle Thromb Vasc Biol. 1994;14:1521-8.
11. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and β -cell dysfunction to the pathophysiology of type2 diabetes. Diabetologia. 2003;46:3-19.
12. 원규장, 윤지성. 제2형 당뇨병에서 포도당 독성과 췌도 베타세포 기능저하. 대한당뇨병학회. 2008;32:175-81.
13. Unger RH. Lipotoxicity in the Pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Diabetes. 1995;44:863-70.
14. 김철희, 김찬희, 박형균, 서교일, 이기엽. 정상 백서 췌장소도에서 지방과부하에 의한 인슐린 분비 장애의 특성 및 항산화제의 효과. 대한당뇨병학회. 2002;26(5):347-56.
15. Kumar V, Fausto N, Abbas A: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease: free radical induced cell injury. 7th ed. W.B. Saunders. 2004, p. 16-8.
16. 김상수, 손석만. 당뇨병과 산화 스트레스: 미토

- 콘드리아 및 NAD(P)H Oxidase에 의한 ROS의 생성 및 역할. 대한당뇨병학회. 2008;32(5):389-98.
17. 박용기. 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 抗酸化作用에 關한 比較研究. 대한본초학회지. 2001;16(1):41-53.
 18. 임자혜. 당뇨 유발 백서에서 홍삼액이 항산화효소 활성화에 미치는 영향. 경기대학교 기초과학 논문집. 2004;17(1):129-45.
 19. 김옥경. 생약학회지. 구기자 분획물이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨 흰쥐에 대한 항당뇨 및 항산화작용에 미치는 효과. 2009;40(2):128-36.
 20. 방미애, 조영자, 김현아. 당뇨 유발쥐에서 인동초의 섭취가 혈청지질과 혈당 및 항산화효소계에 미치는 영향. 한국식생활문화학회지. 2002;17(4):377-86.
 21. 박선동, 주왕석, 고원도. 혈부축어탕과 그 구성약물군이 Alloxan 당뇨 백서의 혈청 조성 및 항산화 효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2002;17(2):93-111.
 22. 안소현. 苦蔘이 RIN-m5F 세포의 인슐린 분비와 α -glucosidase 활성 억제에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2009.
 23. 최정식, 장선규, 조충식, 김철중, 한동운. 소평탕(消平湯)이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 혈당 및 항산화 효소 활성화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):90-103.
 24. Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson 외. 해리슨내과학 16th. 서울: MIP; 2006, p. 2351-82.
 25. UK Prospective Diabetes study group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type2 diabetes(UKDPS 33). UK Prospective Diabetes Study(UKDPS) Group. lancet. 1998;352:837-53.
 26. 윤지성, 원규장, 이형우. 고농도 포도당에 노출된 INS-1세포와 백서 췌도 세포에서 포도당 산화 및 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성. 대한당뇨병학회. 2006;30(4):246-53.
 27. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. Biochem J. 1987;245:243-50.
 28. Baynes JW, Thorpe SR. The role of oxidative stress in diabetic complications. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 1996;3:277-84.
 29. West IC. Radical and oxidative stress in diabetes. Diabet Med. 2000;17:171-80.
 30. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem J. 1981;199:393-8.
 31. 박정래, 이영실, 김보현, 강양호, 김인주, 김용기, 손석만. OLETF 쥐에서 산화스트레스가 IRS-1 degradation을 통한 혈관성 인슐린저항성의 유발. 대한당뇨병학회. 2007;31(1):22-32.
 32. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: Is there a relationship? Diabetologia. 1996;39:357-63.
 33. Kiuchi K, Nejima J, Takano T, Ohta M, Hashimoto M. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients. Heart. 2001;85:87-91.
 34. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. Free Radic Biol Med. 1991;10(5):339-52.
 35. McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK et al. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. Diabetes. 1991;40(3):344-8.
 36. 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.
37. 우원홍, 이승연, 김용수, 백은경, 정영목, 정우열. '活血化瘀'의 동서의학적 이해. 동 의 생 리 병 리 학 회 지. 2001;15(6):833-6.
 38. 黃泰康 主編. 內分泌代謝病中醫治療學. 北京: 中國醫藥科技出版社; 2002, p. 459.
 39. 陳端生. 活血化瘀爲主治療糖尿病28例臨床觀察. 福建中醫藥. 1995;26(5):10.
 40. 李振中. 血瘀與消渴芻議. 遼寧中醫雜誌. 1990;7:11.
 41. 李賽美, 林培政. 糖尿病中醫“濕熱致消”研究近況. 浙江中醫雜誌. 2006;4:242-5.
 42. 劉敏, 李靜, 朱章志, 戴蓮儀. 消渴病濕熱證證治探析. 新中醫. 2005;37(9):3-5.
 43. Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J.* 1973;131(2):187-90.
 44. Sakamoto Y, Higashi T. Glutathione. Japan: Scientific societies; 1989, p. 5.
 45. 손장락. 활성산소와 항산화제. 서울: 바이오메디컬; 2004, p. 66.
 46. Ling H, Heimberg A, Foriers F, Schuit D, Pipeleers. Differential expression of rat insulin I and II messenger ribonucleic acid after prolonged exposure of islet {beta}-cells to elevated glucose levels. *Endocrinology.* 1998; 139:491-5.
 47. Iynedijian PB, Gjinovei A, Renold AE. Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem.* 1988; 263(2):740-4.
 48. Fridolf T, Ahren B. GLP-1(7-36) amide stimulated insulin secretion in rat islets: studies on the mode of action. *Diabetes Res.* 1991;16(4):185-91.
 49. Egan JM, Bulotta A, Hui H, Perfetti R. GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19(2):115-23.
 50. Meier JJ, Nauck MA, Pott A, Heinze K, Goetze O, Bulut K, Schmidt WE, Gallwitz B, Holst JJ. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology.* 2006;130(1):44-54.
 51. Zhang BB, Moller DE. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr opin chem biol.* 2000;4:461-7.