

黃連地黃湯이 Streptozotocin으로 誘發된 糖尿病에 미치는 영향

유동조, 윤경민, 강석봉
대구한의대학교 한의과대학 신계내과학교실

Effects of *Hwangryungeehwang-tang* Aqueous Extracts on Streptozotocin-induced Diabetic Rat

Dong-jo Yu, Gyeong-min Yoon, Seok-bong Kang

Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : The object of this study was to observe the effects of *Hwangryungeehwang-tang* (HRGHT), which has traditionally been used in Korean medicine for treating diabetes, by administering aqueous extracts to streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods : Three different dosages of HRGHT extracts were orally administered once a day for 28 days from 3 weeks after streptozotocin treatment (60 mg/kg, single intraperitoneally administered). 6 groups, of 8 rats per group were used in the present study, selected 3 weeks after streptozotocin treatment based on blood glucose levels and body weights. Changes to the body weights, blood glucose levels, serum low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), triglyceride and total cholesterol levels were observed, as well as changes on the pancreatic, hepatic and kidney malondialdehyde (MDA) contents for lipid peroxidation and glutathione contents for antioxidant effects. The results were compared with a potent antioxidant silymarin 100 mg/kg, of which the effects on streptozotocin-induced diabetes and related complications are already confirmed.

Results : Significant decrease of blood glucose levels, serum LDL, total cholesterol, triglyceride levels, pancreatic, hepatic and renal MDA contents and significant increase of body weights, serum HDL levels, pancreatic, hepatic and renal GSH contents were detected in HRGHT extracts 100 and 200mg/kg administered groups as compared to the streptozotocin control group. The lowest dosage of HRGHT treated group, 50 mg/kg, did not show any favorable effects as compared with the streptozotocin control.

Conclusions : HRGHT has favorable effects on diabetes and related hyperlipidemia. Therefore, more detailed mechanism studies should be conducted in future with efficacy tests of individual herbal compositions of HRGHT and screening of the biological active compounds in the herbs.

Key words : *Hwangryungeehwang-tang* (*Huangliandihuang-tang*), diabetes, hyperlipemia, antioxidant, silymarin

1. 서 론

당뇨병은 한의학에서 消渴의 범주에 속하며, 消渴은 渴而多飲하는 上消, 消穀善飢하는 中消, 渴而

尿數하는 下消로 분류된다¹. 消渴은 인체 내부의 燥熱에서 기인된 소모성 만성질환으로 파악되었고, 多渴, 多食, 多尿를 主症候로 제시하고 있는 病證으로 당뇨병을 포괄하고 있는 넓은 범위의 병증으로 이해될 수 있다².

당뇨병은 insulin분비의 절대적 또는 상대적 부족이나 insulin 표적 세포에서의 insulin의 생물학적 효과 감소로 인하여 발생하는 고혈당 및 이에 수

· 교신저자: 강석봉 대구시 수성구 상동 165번지
대구한의대학교 부속 대구한방병원 신계내과학교실
TEL: 010-6512-0189 FAX: 053-770-2055
E-mail: kangsb@dhu.ac.kr

반되는 대사장애가 장기간 지속되는 상태로 특징 지워지는 질환이다³. 당뇨병은 발병원인에 따라 췌장 β세포의 파괴로 인슐린이 결핍되어 발생하는 제 1형 당뇨병과 가장 흔한 형태인 인슐린 저항성과 인슐린 분비장애에 의해 발생하는 제 2형 당뇨병 및 기타 당뇨병 등으로 분류되고 있다⁴.

고혈당에 기인한 손상을 유발시키는 병인기전 중 중요한 공통적인 과정이 미토콘드리아의 전자수송 연쇄에 의한 과산화(superoxide)의 과다 생산이다⁵. Glutathione(GSH)은 심장병, 협심증, 동맥경화, 재확산(reperfusion) 손상을 예방하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있고, 몸안의 발암물질과 변형물질을 제거하고 세포내 DNA와 다른 민감한 구조물의 산화적 손상을 감소시킨다⁶. 또한 malondialdehyde(MDA)는 지질과산화물의 지표로 사용되는데 과산화지질은 세포막의 다중불포화지방산과 지단백질에서 유리와 연쇄반응하여 부산물로 MDA를 생산한다⁷.

黃連地黃湯은 龔⁸의 《萬病回春》에 처음 수록되어 있으며 三消를 치료한다고 알려져 있다. 최근까지 당뇨병의 한약재 연구로는 참당귀⁹, 八味元¹⁰, 大補陰丸¹¹, 消平湯¹², 生地黃飮子¹³ 등이 있으나 현재까지 黃連地黃湯에 대한 연구는 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 黃連地黃湯(HRGHT)이 당뇨병에 미치는 영향을 알아보기 위하여 streptozotocin으로 당뇨병을 유발한 흰 쥐에 HRGHT 50, 100 및 200 mg/kg을 투여한 후 체중, 혈당, 혈청 성분의 변화, 췌장, 간 및 신장내 MDA, GSH 함량을 측정하고 이를 통하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

암컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트(SLC, Japan) 96마리를 실험실 환경에 7일간 순화시킨 다음 실험

에 사용하였으며, 온도는 20-25 °C, 습도는 30-35%, 명암주기는 12시간 주기로 조절된 환경에서 사육하였다. 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였고, STZ 투여일과 약물 투여시작일 및 최종 희생일에는 18시간 정도 절식시켰으며, picric acid로 개체를 식별하였다. 본 실험에 사용된 모든 실험동물은 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"¹⁴에 준하여 취급하였다.

2) 실험약재

본 실험에 사용된 약재는 대구한의대 의료원 약제과에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 HRGHT1貼 분량의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of *Hwangryungeehwang-tang* (HRGHT) Used in This Study

藥物名	生藥名	重量 (g)
黃連	Coptidis Rhizoma	4
生地黃	Rehmaniae Radix Crudus	4
天花粉	Trichosanthis Radix	4
五味子	Schisandrae Fructus	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
人參	Ginseng Radix Alba	4
乾葛	Puerariae Radix	4
白茯苓	Hoelen	4
麥門冬	Liriopis Tuber	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
竹葉	Phyllostachyos Folium	1
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	4
大棗	Jujubae Fructus	4
Total	13 types	49

All individual herbs were purchased from the pharmacy department of Daegu Haany University after confirm the morphology under microscopy.

2. 방법

1) 黃連地黃湯 물 추출물(HRGHT) 제조

선정된 약제 2貼 분량(98 g)을 취하여 증류수 1,000 ml로 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을

rotary vacuum evaporator(N-N type: LAB Camp, Daejeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PVTFD10A: Ilshin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜, 총 18.87 g(수율 약 19.26%)의 연갈색의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 HRGHT는 -20 °C의 냉동고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 40 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

2) 당뇨병의 유발

총 96 마리의 실험동물 중 80 마리는 streptozotocin (Sigma, MO, USA) 60 mg/kg을 50 mM citrate buffer에 용해시켜, 실험동물 체중 kg 당 5 ml의 농도로 1회 복강투여하였으며, 정상 대조군에서는

streptozotocin 대신 50 mM citrate buffer만 동일한 방법으로 투여하였다. Streptozotocin은 실험물질 투여 3주 전에 투여하였다.

3) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 각 군당 8마리씩 배치하였으며 당뇨를 유발하지 않은 정상대조군, streptozotocin 투여로 당뇨를 유발한 후 멸균 증류수를 투여한 streptozotocin 대조군, 당뇨 유발 후 silymarin(Sigma, MO, USA) 100 mg/kg을 투여한 silymarin 투여군, 당뇨 유발 후 HRGHT 50, 100, 200 mg/kg을 투여한 HRGHT 50, HRGHT 100, HRGHT 200의 6군으로 구분하였으며(Table 2), HRGHT 및 silymarin은 멸균 증류수에 용해시켜 5 ml/kg의 용량으로 매일 1회 28일간 경구 투여하였다.

Table 2. Experimental Design Used in Single Dose Toxicity Test

Groups		Streptozotocin/Test article/Dose (mg/kg/day)
Control	Intact	50 mM Citrate buffer and DW treated (5 ml/kg)
	Streptozotocin	Streptozotocin 60 mg/kg and DW treated
Reference	Silymarin	Streptozotocin and Silymarin 100 mg/kg treated
HRGHT	HRGHT 50	Streptozotocin and HRGHT 50 mg/kg treated
	HRGHT 100	Streptozotocin and HRGHT 100 mg/kg treated
	HRGHT 200	Streptozotocin and HRGHT 200 mg/kg treated

HRGHT, *Hwangryungeehwang-tang* aqueous extracts; HRGHT, silymarin or vehicle (distilled water: DW) were dosed at 5 ml/kg volume, once a day for 28 days from 3 weeks after streptozotocin treatment: 8 rats per group, total 6 groups were used this study: Diabetes and related hyperlipidemia were induced by single intraperitoneal injection of streptozotocin: All animals were sacrificed after 28 days of test article treatment, at 7 weeks after streptozotocin treatment.

4) 체중 측정

Streptozotocin 투여일, 약물 투여 시작일, 투여 7, 14, 21, 27일 및 최종 희생일에 각각 체중을 측정하였으며, 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 약물 투여 전후의 체중변화량인 증체량 (body weight gains)을 측정하였다.

5) 혈당의 측정

Streptozotocin 투여 21일 후 및 최종 희생일에 안와정맥총(orbital plexus)에서 NaF glucose vacuum tube(Becton Dickinson, USA)에 약 0.3 ml의 혈액을 채취한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈장

(plasma)을 분리한 후 자동혈액분석장치(Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈당을 각각 측정하였다.

6) 혈중 HDL(high-density lipoprotein), LDL(low-density lipoprotein), total cholesterol 및 triglyceride 함량의 측정

Streptozotocin 투여 21일 후 및 최종 희생일에 안와정맥총과 후대정맥에서 각각 약 0.5 및 6 ml의 혈액을 채취하였으며, 상온에서 1시간 정도 방치한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리한 후 자동혈액분석장치(Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈중 HDL, LDL, total cholesterol 및

triglyceride 함량을 각각 측정하였다.

7) 조직 내 MDA(malondialdehyde) 및 GSH (glutathione) 함량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 췌장, 간 및 신장을 적출한 다음, 멸균 생리식염수로 세척하고 주변 지방조직을 제거한 후 Kavutcu et al¹⁵의 방법으로 9 vols ice-cold 0.15 M/L KCl 및 1.9 mM/L ethylenediaminetetraacetic acid가 함유된 용액에서 homogenize하고, 상층액을 분리하여 MDA 및 GSH 함량을 측정하였다. 조직내 단백질 함량은 Lowry 등¹⁶의 방법으로 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도(lipid peroxidation)는 Draper와 Hadley¹⁷의 방법으로 2-thiobarbituric acid를 이용하여 MDA (nmole)/g protein 단위로 측정하였다. 또한 항산화 정도를 판단하기 위해, Eyer 와 Podhradsky¹⁸의 방법으로 microplate reader에 적응시킨 enzymatic recycling procedure를 이용하여 GSH (μmole)/g protein 단위로 측정하였다.

3. 통계처리

모든 수치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 다중비교 검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산 동질성을 Levene's test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences(LSD) test로

사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W(MW)를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p<0.05 이한 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 체중의 변화

Silymarin 및 HRGHT 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 체중의 증가가 투여 21 일후부터 인정되었으며, 약물투여 기간 및 전체 실험 기간 동안의 증체량 역시 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. 한편 HRGHT 100 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 체중의 증가가 투여 27 일 후부터 인정되었으며, 약물투여 후 및 실험 전 기간 동안의 증체량 역시 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. 한편, HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 체중 및 증체량의 변화를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Changes on the Body Weight Gains after Streptozotocin and Test Article Administration

Groups	Body weight gains		
	Diabetes and related complications induce periods, before start of test article treatment (3 weeks)	After test article treatments (4 weeks)	Total experimental periods (7 weeks)
Controls	Intact	46.75±4.33	73.00±8.67
	Streptozotocin	1.25±5.20 ^a	-34.75±3.77 ^a
Silymarin 100 mg/kg	1.38±3.58 ^a	-9.75±4.43 ^{ab}	-8.38±6.39 ^{ab}
HRGHT	50 mg/kg	-0.63±2.20 ^a	-32.38±9.24 ^a
	100 mg/kg	1.25±3.28 ^a	-16.75±9.62 ^{ab}
	200 mg/kg	-0.38±1.60 ^a	-8.75±6.41 ^{ab}

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (g): ^a p<0.01 compared with intact control; ^b p<0.01 compared with streptozotocin control.

2. 혈당의 변화

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 최종 희생일의 혈당 및 투여 전후 혈당 변화량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50

mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 혈당의 변화를 나타내었으며, 모든 투여군에서 약물 투여 전 혈당은 streptozotocin 대조군과 유사하게 관찰되었다(Table 4).

Table 4. Changes on the Blood Glucose Levels after Streptozotocin and Test Article Administration

Groups		Blood glucose levels		
		At 3 weeks after Streptozotocin treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)
Controls	Intact	106.88±10.64	108.00±10.00	1.13±3.09
	Streptozotocin	351.50±15.21 ^a	470.00±21.45 ^a	118.50±20.47 ^b
Silymarin 100 mg/kg		353.63±14.79 ^a	375.75±18.75 ^{ac}	22.13±13.11 ^{bd}
50 mg/kg		354.25±17.63 ^a	467.63±14.02 ^a	113.38±9.55 ^b
HRGHT 100 mg/kg		352.50±14.06 ^a	397.25±17.29 ^{ac}	44.75±25.88 ^{bd}
200 mg/kg		354.38±12.64 ^a	375.38±20.66 ^{ac}	21.00±12.84 ^{bd}

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (mg/dl): ^a $p<0.01$ compared with intact control; ^b $p<0.01$ compared with intact control; ^c $p<0.01$ compared with streptozotocin control; ^d $p<0.01$ compared with streptozotocin control.

3. 혈중 HDL 및 LDL 함량의 변화

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 최종 희생일의 혈중HDL 함량 및 투여 전후 혈중 HDL 함량 변화량의 증가가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 혈중 HDL 함량의 변화를 나타내었으며, 모든 투여군에서 약물 투여 전 혈중 HDL 함량은 streptozotocin 대조군과 유사하게 관찰되었다(Table 5).

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 최종 희생일의 LDL 함량 및 투여 전후 혈중 LDL 함량 변화량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 혈중 LDL 함량의 변화를 나타내었으며, 모든 투여군에서 약물 투여 전 혈중 LDL 함량은 streptozotocin 대조군과 유사하게 관찰되었다(Table 6).

Table 5. Changes on the Serum HDL Levels after Streptozotocin and Test Article Administration

Groups		Serum HDL levels		
		At 3 weeks after Streptozotocin treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)
Controls	Intact	75.63±16.65	77.13±14.67	1.50±3.25
	Streptozotocin	35.75±8.86 ^b	21.88±5.00 ^b	-13.88±6.88 ^a
Silymarin 100 mg/kg		35.38±9.46 ^b	35.50±10.77 ^{bd}	0.13±3.00 ^c
50 mg/kg		35.88±7.97 ^b	22.38±2.07 ^b	-13.50±7.31 ^a
HRGHT 100 mg/kg		35.88±5.67 ^b	33.38±4.60 ^{bd}	-2.50±4.41 ^c
200 mg/kg		35.75±7.09 ^b	36.63±9.12 ^{bd}	0.88±4.76 ^c

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (mg/dl): ^a $p<0.01$ compared with intact control; ^b $p<0.01$ compared with intact control; ^c $p<0.01$ compared with Streptozotocin control; ^d $p<0.01$ compared with Streptozotocin control.

Table 6. Changes on the Serum LDL Levels after Streptozotocin and Test Article Administration

Groups		Serum LDL levels		
		At 3 weeks after Streptozotocin treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)
Controls	Intact	9.25±1.83	9.75±2.05	0.50±1.31
	Streptozotocin	13.75±2.49 ^a	33.75±5.57 ^b	20.00±5.78 ^b
Silymarin	100 mg/kg	13.38±1.77 ^a	20.38±1.92 ^{bc}	7.00±3.30 ^{bc}
	50 mg/kg	13.88±2.30 ^a	33.88±5.38 ^b	20.00±5.71 ^b
HRGHT	100 mg/kg	13.50±2.27 ^a	25.00±4.66 ^{bd}	11.50±3.02 ^{bc}
	200 mg/kg	13.75±1.83 ^a	21.00±2.98 ^{bc}	7.25±3.15 ^{bc}

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (mg/dl): ^a p<0.01 compared with intact control; ^b p<0.01 compared with intact control; ^c p<0.01 and ^d p<0.05 compared with streptozotocin control.

4. 혈중 triglyceride 및 total cholesterol 함량의 변화

Silymarin과 HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 최종 희생일의 triglyceride 함량 및 투여 전후 혈중 triglyceride 함량 변화량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 혈중 triglyceride 함량의 변화를 나타내었으며, 모든 투여군에서 약물 투여 전 혈중 triglyceride 함량은 streptozotocin 대조군과 유사하게 관찰되었다(Table 7).

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 최종 희생일의 total cholesterol 함량 및 투여 전후 혈중 total cholesterol 함량 변화량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 혈중 total cholesterol 함량의 변화를 나타내었으며, 모든 투여군에서 약물 투여 전 혈중 total cholesterol 함량은 streptozotocin 대조군과 유사하게 관찰되었다(Table 8).

Table 7. Changes on the Serum Triglyceride Levels after Streptozotocin and Test Article Administration

Groups		Serum triglyceride levels		
		At 3 weeks after Streptozotocin treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)
Controls	Intact	38.25±4.50	39.13±4.67	0.88±1.36
	Streptozotocin	326.63±23.29 ^a	570.75±91.25 ^a	244.13±93.69 ^a
Silymarin	100 mg/kg	327.00±30.07 ^a	425.00±38.59 ^{ab}	98.00±33.72 ^{ab}
	50 mg/kg	322.50±21.76 ^a	573.63±79.59 ^a	251.13±71.23 ^a
HRGHT	100 mg/kg	323.88±20.79 ^a	462.00±57.09 ^{ad}	138.13±50.56 ^{ad}
	200 mg/kg	325.75±17.69 ^a	429.25±43.73 ^{ac}	103.50±55.12 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (mg/dl): ^a p<0.01 compared with intact control. ^b p<0.01 and ^c p<0.05 compared with streptozotocin control.

Table 8. Changes on the Serum Total Cholesterol Levels after Streptozotocin and Test Article Administration

Groups	Serum total cholesterol levels			
	At 3 weeks after Streptozotocin treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)	
Controls	Intact	76.63±8.26	78.13±8.66	1.50±2.14
	Streptozotocin	137.50±7.93 ^a	222.50±14.37 ^a	85.00±14.70 ^b
Silymarin	100 mg/kg	138.00±9.04 ^a	182.13±21.36 ^c	44.13±28.55 ^{bd}
	50 mg/kg	138.13±6.60 ^a	222.13±14.01 ^a	84.00±12.43 ^b
HRGHT	100 mg/kg	137.13±8.18 ^a	195.50±17.65 ^c	58.38±16.78 ^{bd}
	200 mg/kg	138.00±8.05 ^a	183.63±20.46 ^c	45.63±22.30 ^{bd}

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (mg/dl): ^a p<0.01 compared with intact control; ^b p<0.01 compared with intact control; ^c p<0.01 compared with streptozotocin control; ^d p<0.01 compared with streptozotocin control.

5. 췌장 내 MDA 및 GSH함량의 변화

Silymarin 및 HRGHT 100과 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 췌장내 MDA함량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 췌장 내 MDA 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 1).

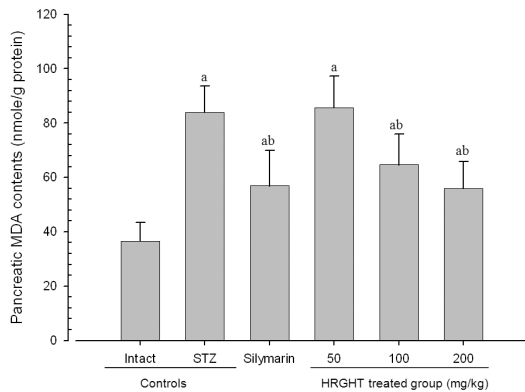


Fig. 1. Changes on the pancreatic malondialdehyde contents after streptozotocin and test article administration.

Note that the pancreatic malondialdehyde (MDA) contents was significantly (p<0.01) increased in streptozotocin control as compared with intact control. It means, lipid peroxidation was increased by treatment of streptozotocin. However, these

pancreatic MDA contents increases were significantly (p<0.01) inhibited by treatment of silymarin, *Hwangryungeehwang-tang* 100 and 200 mg/kg, respectively. No meaningful changes on the pancreatic MDA contents were detected in *Hwangryungeehwang-tang* 50 mg/kg treated group as compared with streptozotocin control in this study.

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats (nmole/g protein); Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights; STZ, streptozotocin; ^a p<0.01 compared with intact control; ^b p<0.01 compared with streptozotocin control.

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 췌장 내 GSH 함량의 증가가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 췌장 내 GSH 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 2).

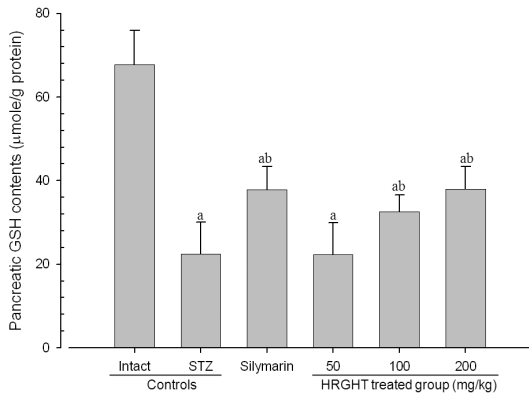


Fig. 2. Changes on the Pancreatic Glutathione Contents after Streptozotocin and Test Article Administration.

Note that the pancreatic glutathione (GSH) content was significantly ($p < 0.01$) decreased in streptozotocin control as compared with intact control. It means, oxidative stress was induced by treatment of streptozotocin. However, these pancreatic glutathione contents decreases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of silymarin, *Hwangryungeehwang-tang* 100 and 200 mg/kg, respectively. No meaningful changes on the pancreatic GSH contents were detected in *Hwangryungeehwang-tang* 50 mg/kg treated group as compared with streptozotocin control in this study.

Values are expressed mean \pm S.D. of eight rats ($\mu\text{mole/g protein}$): Silymarin was dosed as 100mg/kg of body weights; STZ, streptozotocin; ^a $p < 0.01$ compared with intact control; ^b $p < 0.01$ compared with streptozotocin control.

6. 간 내 MDA 및 GSH 함량의 변화

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 간 내 MDA 함량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 간 MDA 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 3).

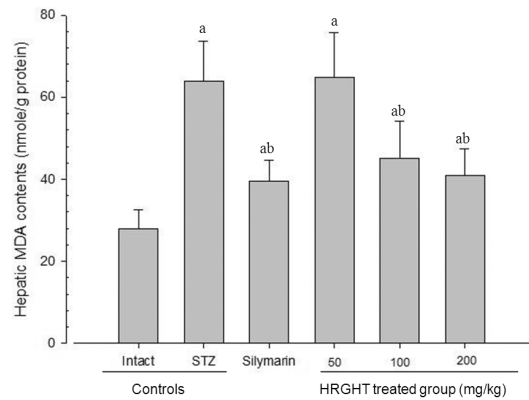


Fig. 3. Changes on the Hepatic Malondialdehyde Contents after Streptozotocin and Test Article Administration.

Note that the hepatic malondialdehyde (MDA) contents was significantly ($p < 0.01$) increased in streptozotocin control as compared with intact control. It means, lipid peroxidation was increased by treatment of streptozotocin. However, these hepatic MDA contents increases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of silymarin, *Hwangryungeehwang-tang* 100 and 200mg/kg, respectively. No meaningful changes on the hepatic MDA contents were detected in *Hwangryungeehwang-tang* 50mg/kg treated group as compared with streptozotocin control in this study.

Values are expressed mean \pm S.D. of eight rats (nmole/g protein): Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights; STZ, streptozotocin; ^a $p < 0.01$ compared with intact control; ^b $p < 0.01$ compared with streptozotocin control.

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$ or $p < 0.05$) 간 내 GSH 함량의 증가가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 간 내 GSH 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 4).

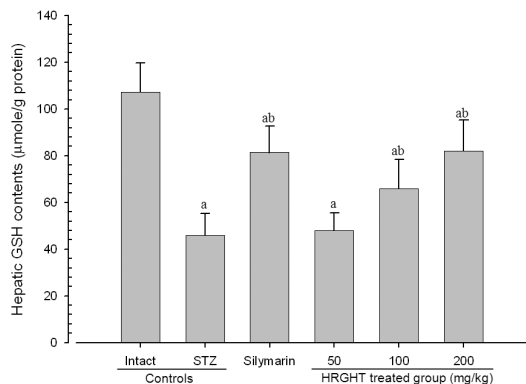


Fig. 4. Changes on the Hepatic Glutathione Contents after Streptozotocin and Test Article Administration.

Note that the hepatic glutathione (GSH) content was significantly ($p < 0.01$) decreased in streptozotocin control as compared with intact control. It means, oxidative stress was induced by treatment of streptozotocin. However, these hepatic glutathione contents decreases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of silymarin, *Hwangryungeehwang-tang* 100 and 200 mg/kg, respectively. No meaningful changes on the hepatic GSH contents were detected in *Hwangryungeehwang-tang* 50 mg/kg treated group as compared with streptozotocin control in this study.

Values are expressed mean \pm S.D. of eight rats ($\mu\text{mole/g protein}$): Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights; STZ, streptozotocin; ^a $p < 0.01$ compared with intact control; ^b $p < 0.01$ compared with streptozotocin control.

7. 신장 내 MDA 및 GSH 함량의 변화

Silymarin, HRGHT 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 신장 내 MDA 함량의 감소가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 신장 내 MDA 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 5).

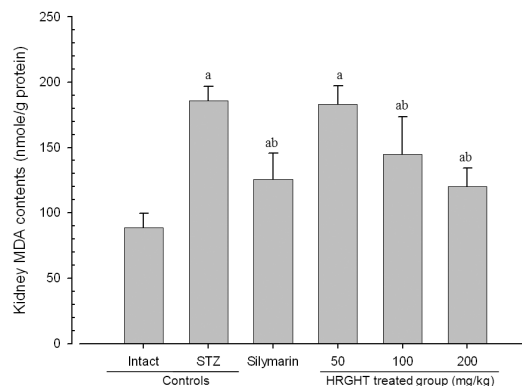


Fig. 5. Changes on the Kidney Malondialdehyde Contents after Streptozotocin and Test Article Administration.

Note that the kidney malondialdehyde (MDA) contents was significantly ($p < 0.01$) increased in streptozotocin control as compared with intact control. It means, lipid peroxidation was increased by treatment of streptozotocin. However, these kidney MDA contents increases were significantly ($p < 0.01$) inhibited by treatment of silymarin, *Hwangryungeehwang-tang* 100 and 200 mg/kg, respectively. No meaningful changes on the kidney MDA contents were detected in *Hwangryungeehwang-tang* 50 mg/kg treated group as compared with streptozotocin control in this study.

Values are expressed mean \pm S.D. of eight rats (nmole/g protein): Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights; STZ, streptozotocin; ^a $p < 0.01$ compared with intact control; ^b $p < 0.01$ compared with streptozotocin control.

Silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 streptozotocin 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) 신장 내 GSH 함량의 증가가 인정되었다. 한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 유사한 신장 내 GSH 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 6).

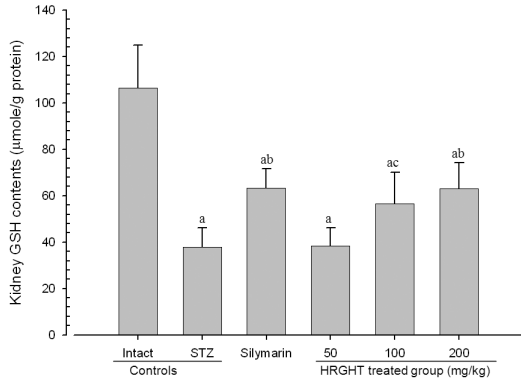


Fig. 6. Changes on the Kidney Glutathione Contents after Streptozotocin and Test Article Administration.

Note that the kidney glutathione (GSH) content was significantly ($p < 0.01$) decreased in streptozotocin control as compared with intact control. It means, oxidative stress was induced by treatment of streptozotocin. However, these kidney glutathione contents decreases were significantly ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) inhibited by treatment of silymarin, *Hwangryungeehwang-tang* 100 and 200 mg/kg, respectively. No meaningful changes on the kidney GSH contents were detected in *Hwangryungeehwang-tang* 50 mg/kg treated group as compared with streptozotocin control in this study. Values are expressed mean \pm S.D. of eight rats ($\mu\text{mole/g protein}$): Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights; STZ, streptozotocin; ^a $p < 0.01$ compared with intact control; ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.05$ compared with streptozotocin control.

IV. 고찰

본 연구에서는 HRGHT의 당뇨병에 대한 효과 및 유효 투여량을 규명하기 위하여 streptozotocin 으로 당뇨를 유발한 흰쥐에 HRGHT 50, 100, 200 mg/kg의 세 가지 농도로 28일간 경구투여한 후 혈당, 체중, HDL, LDL, total cholesterol, triglyceride의 함량 및 췌장, 간, 신장 각각의 MDA, GSH의 함량을 측정하였다.

Streptozotocin은 인슐린을 생산하는 췌장의 β

세포를 선택적으로 파괴시키는 약물로, 실험적 당뇨병을 유발시킨다¹⁹. Streptozotocin 유발 당뇨병 모델은 현재 가장 흔히 사용되는 당뇨병에 대한 실험동물 모델로 알려져 있다^{14,20}.

Silymarin(milk thistle extracts)은 엉겅퀴 추출물에서 유래된 flavonoid로, 강력한 항산화 효과를 가지고 있으며, 간세포 등 신체의 세포에 대해 독소(toxin)에 대한 강력한 보호 작용을 나타낸다²¹. 또한 silymarin은 강력한 항산화 작용으로 type 1 및 type 2 당뇨병 및 관련 합병증을 매우 효과적으로 예방 또는 치료하는 것으로 알려져 있어, 현재 당뇨병 및 당뇨 합병증 치료제 개발에 있어 가장 흔히 사용되는 대조 약물(reference) 중 하나이다²².

혈당의 상승은 당뇨병의 가장 기본적인 증후 중 하나로, 혈당의 감소는 당뇨병 치료 시 당연한 목표가 되어왔다¹⁴. 본 실험의 결과, HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 streptozotocin 대조군에 비해 현저한 혈당 감소가 관찰된 점은 HRGHT의 당뇨병에 대한 치료효과를 직접적으로 나타내는 증거로 판단된다.

Streptozotocin 투여 후 인정된 체중 감소 증례량의 감소는 streptozotocin 자체의 직접적인 독성 또는 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨병에 수반된 이차적인 변화로 판단되며, 현재까지 이러한 체중의 변화는 대사성 질환에 효과가 있는 활성 물질의 탐색에 있어 가장 기본적인 지표로 사용되어 왔다²³. HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 streptozotocin 대조군에 비해 현저한 체중 감소 억제 효과가 관찰된 점은 HRGHT의 당뇨병에 대한 치료효과를 간접적으로 나타내는 증거로 판단된다. 또한 일반적으로 면역활성 효과가 있는 물질 투여 시 체중의 증가 등 성장 촉진 효과가 인정되는 것으로 알려져 있어²⁴, 면역활성 등의 다른 약리작용에 수반된 이차적 변화일 가능성 역시 배제할 수 없다.

고지혈증은 전형적인 당뇨병증의 하나로²⁵, 당뇨병 시 현저한 혈중 LDL, triglyceride 및 total cholesterol

함량의 증가가 혈중 HDL 함량의 감소와 함께 초래되며, 이들의 변화 억제에는 당뇨병에 의한 고지혈증 억제를 나타내는 직접적인 증거로 활용되어 왔다²⁶. 일반적으로 혈중 LDL, triglyceride 및 total cholesterol 함량의 증가에 수반된 혈중 HDL 함량의 감소가 가장 심각한 문제로 받아들여지고 있으며²⁷, 이러한 변화를 억제하는 방향으로 고지혈증 치료제가 개발되어 왔다²⁸. 본 실험의 결과, 28 일간의 연속적인 HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여는 streptozotocin에 의한 혈중 LDL, triglyceride 및 total cholesterol 함량의 증가와 혈중 HDL 함량의 감소를 현저히 억제하였다.

최근의 연구에 따르면, 당뇨병의 유발에 free radical에 의한 항산화 방어기전의 변화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고²⁹, oxidative stress가 여러 가지 당뇨 합병증의 유발에 관여한다고 알려져 있다¹⁹. 특히 항산화 효과의 억제와 함께 oxidative stress의 증가는 당뇨병시 더 많은 free radical을 형성하고³⁰, 이렇게 형성된 free radical 들은 당뇨 합병증의 원인이 된다³¹. 본 실험의 결과에서도, 지질 과산화에 의해 streptozotocin 투여 후 췌장, 간 및 신장의 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소가 초래되었다. 한편 이러한 조직 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소에 대한 개선효과가 100 및 200 mg/kg의 HRGHT 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 유의성이 인정되었으므로, HRGHT의 streptozotocin 유발 당뇨병에 대한 효과가 항산화 효과에 의해 초래되는 것으로 판단된다.

본 실험의 결과, streptozotocin 투여에 의해 현저한 체중의 감소, 혈당의 증가, 혈중 LDL, triglyceride 및 total cholesterol 함량의 증가와 함께 혈중 HDL 함량의 감소가 초래되어, 이전의 보고들³²에서와 같이 streptozotocin에 의해 당뇨 및 고지혈증이 초래된 것으로 판단된다. 또한 췌장, 간 및 신장 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소가 인정되어, 이전의 보고들¹⁹과 유사하게, 지질 과산화에 의

한 항산화 활성의 억제로 인해 당뇨병이 초래된 것으로 판단된다. 한편 본 실험에 사용한 HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 이러한 streptozotocin 유발 혈당 증가 및 고지혈증이 유의성 있게 현저히 감소되어, HRGHT는 고혈당증 및 고지혈증에 매우 유효할 것으로 판단된다.

한편 HRGHT 50 mg/kg 투여군에서는 streptozotocin 대조군과 비교하여 유의한 효과가 인정되지 않아, 비교적 우수한 효과가 인정된 100 mg/kg 전후가 HRGHT의 유효용량으로 판단되며, 본 실험의 결과 HRGHT 200 mg/kg은 100 mg/kg의 silymarin 투여군과 유사한 효과를 나타내었다. 한편 silymarin, HRGHT 100 및 200 mg/kg투여에 의해 췌장, 간 및 신장 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소가 매우 효과적으로 억제되어, HRGHT의 혈당 강하 및 고지혈증 치료 효과가 지질 과산화 억제에 의한 항산화에 의해 유발되는 것으로 판단되나, 면역활성이나 항염효과 등 다양한 방면의 기전적인 연구를 더 수행해야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

黃連地黃湯(HRGHT)을 투여한 후 체중, 혈당, 혈청 성분의 변화, 췌장, 간 및 신장내 MDA, GSH 함량을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 streptozotocin 대조군에 비해 체중 및 증체량의 감소를 유의하게 억제하였다.
2. HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 streptozotocin 대조군에 비해 혈중 glucose 함량을 유의하게 감소시켰다.
3. HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 streptozotocin 대조군에 비해 혈중 HDL 함량을 유의하게 증가시키고 혈중 LDL, triglyceride 및 total cholesterol 함량을 유의하게 감소시켰다.
4. HRGHT 100 및 200 mg/kg 투여군에서 streptozotocin

대조군에 비해 체장, 간 및 신장 내 MDA 함량을 유의하게 감소시키고, GSH 함량을 유의하게 증가시켰다.

이상의 결과에서 HRGHT는 streptozotocin으로 유발한 당뇨병 흰 쥐에서 체중감소, 고혈당, 고지혈증 및 체장, 간, 신장의 산화적 손상 등에 유의한 효과를 나타내었다.

참고문헌

1. 두호경. 동의신계학(하). 서울: 성보사; 2006, p. 1131.
2. 강석봉. 消渴의 전변증과 糖尿病의 만성 합병증에 대한 비교 고찰. 대한한의학회지 1998;19:137-52.
3. 서울대학교 의학대학 내과학교실. 최신지견 내과학. 서울: 서울대학교 출판부; 1996, p. 708-801.
4. 김응진 외. 당뇨병학. 서울: 서울대학교 출판부; 1992, p. 173-7.
5. 김응진, 민현기, 최영길, 이태희, 허갑범, 신순현, 등. 당뇨병학. 제3판. 서울: 고려의학; 2005, p. 408-9.
6. 김영근. 항산화제. 서울: 여문각; 2004, p. 3-4.
7. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 2003;80:1-7.
8. 龔廷賢 選, 陳柱杓 編譯. 對譯萬病回春. 서울: 法人文化社; 2007, p. 746.
9. 박만중, 강신정, 김애정. Septozotocin 유도 흰쥐에서 참당귀(Angelica gigas Naki) 추출물의 당뇨 개선 효과. 한국식품영양학회지 2009;22(2):246-51.
10. 이운재, 문미현, 조영기, 임은경, 황상일, 백동기 등. 당뇨합병증으로 인한 만성 신부전 환자 1례에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지 2004; 25(4-2):442-9.
11. 최우석, 윤경민, 이연경, 강석봉. 대보음환이 streptozotocin으로 유도된백서의 당뇨병 및 당뇨병 합병증에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2009;30(4):858-79.
12. 최정식, 장선규, 조충식, 김철중, 한동운. 소평탕이 streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 혈당 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2009;29(1):90-103.
13. 최창원, 김희철. 생지황음자가미가 streptozotocin으로 유발된 당뇨생쥐에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2005;26(1):12-47.
14. Institute of Laboratory Animal Resources (Commission on Life Sciences, National Research Council, USA). Guide for the care and use of laboratory animals. 7th ed. Washington, D.C.: National Academic press; 1996, p. 1-118.
15. Kavutcu M, Canbolat O, Oztürk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinci C, et al. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. *Nephron* 1996;72:269-74.
16. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
17. Draper HH, Hadley M. Methods in Enzymology. New York: Academic Press; 1990, p. 421.
18. Eyer P, Podhradský D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1986;153:57-66.
19. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet Med* 1992;9:297-9.
20. Quine SD, Raghu PS. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney

- and heart. *Pharmacol Rep* 2005;57:610-5.
21. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* 2001;15:465-89.
 22. Lorenz D, Mennicke WH. Elimination of drugs in cholecystectomized patients, Studies with silymarin in patients with extrahepatic complications. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1981;3:103-6.
 23. Uchiyama S, Yamaguchi M. Oral administration of beta-cryptoxanthin prevents bone loss in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1766-9.
 24. Pinzone Fox, ML, Sastry MK, Parenti DM, Simon, GL. Plasma leptin concentration increases early during highly active antiretroviral therapy for acquired immunodeficiency syndrome, independent of body weight. *J Endocrinol Invest* 2005;28:1-3.
 25. Ducobu J. Dyslipidaemia and diabetes mellitus. *Rev Med Liege* 2005;60:578-85.
 26. Tunali S, Yanardag R. Effect of vanadyl sulfate on the status of lipid parameters and on stomach and spleen tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2006;53:271-7.
 27. Kamada T, Hata J, Kusunoki H, Ito M, Tanaka S, Kawamura Y, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* increases the incidence of hyperlipidaemia and obesity in peptic ulcer patients. *Dig Liver Dis* 2005;37:39-43.
 28. Cheng JW. Rosuvastatin in the management of hyperlipidemia. *Clin Ther* 2004;26:1368-87.
 29. Garg MC, Singh KP, Bansal DD. Effect of vitamin C supplementation on oxidative stress in experimental diabetes. *Indian J Exp Biol* 1997;35:264-6.
 30. Collier A, Wilson R, Bradley H, Thomson JA, Small M. *Free radical activity in type 2 diabetes. Diabet Med* 1990;7:27-30.
 31. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.
 32. Figarola JL, Scott S, Loera S, Xi B, Synold T, Rahbar S. *Renoprotective and lipid-lowering effects of LR compounds, novel advanced glycation end product inhibitors, in streptozotocin-induced diabetic rats. Ann NY Acad Sci* 2005;1043:767-76.