

## 노팔천연복합물이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨 쥐의 혈당 및 췌장조직에 미치는 영향

윤진아<sup>1</sup> · 김제중<sup>2</sup> · 송병춘<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>배화여자대학교 식품영양과, <sup>2</sup>서울과학기술대학교 식품공학과, <sup>3</sup>건국대학교 자연과학대학 식품생명과학부

### Effects of *Opuntia ficus-indica* Complexes on Blood Glucose and Pancreatic Islets Histology in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Jin A Yoon<sup>1</sup>, Je Jung Kim<sup>2</sup> and Byeng Chun Song<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 110-735, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Science, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea

<sup>3</sup>Division of Food Bioscience, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

#### Abstract

This study was carried out to investigate the effects of *Opuntia ficus-indica* complex (OF) on blood glucose, glucose tolerance, plasma insulin level and histopathological appearance of pancreatic islets in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Thirty-two male Sprague-Dawley rats were divided into non-diabetic control (NC), diabetic control (DC), diabetic OF of 2% (OF-2) and diabetic OF of 5% (OF-5) and fed experimental diets for 3 weeks. Compared to the DC group fasting blood glucose levels in the OF-2 and OF-5 groups were significantly ( $p < 0.05$ ) reduced while fasting plasma insulin level in the OF-2 and OF-5 groups were significantly ( $p < 0.05$ ) increased. Glucose tolerance in the OF-2 and OF-5 groups were improved. Histopathological observation of pancreatic islets of the OF-2 and OF-5 groups showed hyperplasia which was very similar to NC. Numbers of  $\beta$ -cells in OF-2 ( $47.81 \pm 0.92$ ) and OF-5 ( $81.64 \pm 2.80$ ) were higher than numbers of  $\beta$ -cells in DC ( $13.18 \pm 1.01$ ). These results imply that the intake of OF improves  $\beta$ -cell proliferation and prevents the death of  $\beta$ -cells in STZ-induced diabetic rats.

**Key words :** *Opuntia ficus-indica*, diabetes, insulin, pancreatic islets, histopathological appearance.

#### 서 론

당뇨병은 유전적 요인과 더불어 후천적 요인인 비만, 식생활, 운동 부족, 스트레스 등에 의해 영향을 받는 질병으로 크게 I형 당뇨와 II형 당뇨로 구분할 수 있다. 이 중 I형 당뇨는 면역 장애 등으로 인하여 인슐린을 생성하고, 분비하는 췌장 랑게르한스섬의  $\beta$ -세포가 파괴되어 인슐린 분비량이 부족해짐으로써 나타나게 된다. 하지만, 현대 의학에서는 아직 당뇨병을 근본적으로 치료할 수 있는 방법이 개발되지 않았으며, 다만 정상적인 수준의 혈당을 유지하는 것이 최선의 치료방법으로 알려져 있다(Yoon JA 2007).

당뇨병의 치료방법으로는 약물요법, 운동요법, 식이요법의 3가지 방법이 주로 시도되고 있으며(Bailey & Day 1989), 이 중에 약물요법의 경우 화학물질을 사용하기 때문에 여러 부작용이 수반되고 있어 이에 대한 대안으로 천연물을 이용한 당뇨치료제의 개발이 주목을 받고 있으며, 민간요법으로

개고기, 엄나무, 솔잎, 참깨 및 참기름을 조합하여 '수정로'라는 수증기 유출액을 사용하여 50%의 혈당 강하 효과를 확인했으며(Yang *et al* 2004), 천화분, 갈근, 맥문동, 생지황, 오미자, 감초 및 참쌀을 조합한 '옥천산'이라는 분말을 대조사료에 3% 수준으로 첨가하여 당뇨쥐에서 혈중 지질을 낮추는 효과를 확인하였다(Koh & Kim 2002).

한편, 노팔이라 불리는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill)은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 열대성 식물로 중남미에 많이 분포하며, 우리나라에서는 백년초선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino)이 제주도과 남해안 일부 지역 등지에 자생하고 있는 귀화식물로 전해지고 있다. 멕시코에서는 민간요법으로 당뇨 치료에 노팔 등의 손바닥선인장을 이용하고(Lozoya M 1989), STZ으로 당뇨를 유발한 쥐에게 손바닥선인장의 열매 및 줄기를 250 mg/kg 투여하였을 때 혈당이 감소하였다는 보고도 있다(Moon YI, 2004). 또한 여주, 천화분, 지황, 산약, 호로파, 삼칠근 등이 당뇨에 효능이 있다고 보고된 바 있다(Sathishsekar & Subramanian 2005, Zhang *et al* 2004, Lim & Choi 1997, Annida & Princ 2004,

\* Corresponding author : Byeng Chun Song, Tel : +82-43-840-3583, Fax : +82-43-840-3585, E-mail : bcsong@kku.ac.kr

Xie *et al* 2002). 이에 본 연구는 노팔(*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill)에 여주, 천화분, 목단피, 지황, 산약, 호로과, 삼칠근 등의 천연물들을 조합하여 천연물 각각의 혈당 강하 효과보다 우수한 효과와 기작을 구명하기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

노팔복합물(*Opuntia ficus-indica* complex; OF)의 원료로 사용된 손바닥선인장 줄기는 멕시코산, 그 외의 원료는 중국산으로, 건조된 상태로 구입하여 분쇄 후, Table 1에 제시된 비율과 같이 배합하였다.

### 2. 실험동물 및 실험식이

(주)샘타코에서 평균체중 250(±10) g의 Sprague-Dawley rat 8주령 수컷 32마리를 분양 받아 실험동물로 이용하였고, 7일간의 적응기간 후 무작위로 정상군(Non-diabetic Control, NC), 당뇨 대조군(Diabetic Control, DC), 당뇨를 유발하여 2%(3 g/kg body weight) 노팔복합물(OF-2)과 5%(7.5 g/kg body weight) 노팔복합물(OF-5)을 급여한 당뇨 실험군의 4개 군으로 각각 8마리씩 나누어 3주간 사육하였다. 각 실험동물은 금속 cage에 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실내 환경은 온도 20~25°C, 습도 60~70% 및 광주기 12시간을 유지하였다.

기초식은 AIN-76(American Institute Nutrition-76)의 사양표준에 준하여 제조되었고, 각 실험에서 당뇨를 유발하지 않은 정상군과 당뇨를 유발한 당뇨 대조군은 기초식을 자유채식시켰고, 당뇨를 유발한 후 2% 노팔복합물과 5% 노팔복합물을 급여한 당뇨 실험군은 기초식에 각각 2%와 5% 수준으로 노팔복합물을 첨가하여 자유채식시켰으며, 음수는 수돗물을 자율 섭취케 하였다.

### 3. 당뇨 유발

실험동물은 7일간의 적응기간을 두고 실험식을 급여하

기 전 12시간 동안 절식시킨 다음, 당뇨군은 STZ(streptozotocin)을 0.1 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 STZ 50 mg/kg 씩 1회 복강 주사하였다. 24시간 경과 후 당뇨 유발 정도를 요당 측정용 strip(영동제약, Uriscan GP2)을 이용하여 확인하였고, 요당이 300 mg/dL 이하인 개체는 2회 복강 주사하고, 또 다시 24시간 경과 후 당뇨 유발 정도를 확인하여 300 mg/dL 이하인 것은 3회 복강 주사하였다. 그리하여 최종 당뇨유발 후 12시간 절식시켜 공복 시 혈당이 300 mg/dL 이상에 이르도록 하였다. 당뇨를 유발하지 않은 정상군은 50 mg/kg의 saline 용액을 주사하였다.

### 4. 혈당 측정 및 당내성 검사

혈당은 당뇨 유발 후 실험 식이에 들어가기 전에 측정하였고, 실험기간 중에는 1주 간격으로 3주간 측정하였으며, 12시간 절식 후 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 공복 시 혈당을 혈당측정기(MyCare GAM-2200, 녹십자)로 측정하였다.

실험식을 급여한 지 3주 후 12시간 절식시켜 공복 시 혈당을 측정된 뒤, glucose(50 mg/kg body weight)를 복강주사한 다음 30, 60, 90, 120분 경과 후에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기로 혈당을 측정하였다.

### 5. 혈장 인슐린 검사

인슐린 함량을 측정하기 위한 혈액은 실험식이 급여 3주 후, 12시간을 절식시킨 다음 마취제(케타민 액(유한양행)과 럼폰 액((주)바이엘코리아)을 1:1로 혼합) 2.5 mL/kg을 주사하여 마취시킨 후 심장에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 즉시 얼음에 3분간 정치시킨 뒤 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 얻어 분석하였다.

혈장 중 인슐린 함량은 방사선면역측정법(Desbuquois & Aurbach 1971)에 의하여 측정하였는데, 외부분석기관(삼광의료재단)에 분석을 의뢰하였다.

### 6. 췌장 조직의 H&E 염색

췌장 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 이상 고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 4 μm 두께로 절편은 제조하였다. 절편된 조직을 slide glass 위에 부착시켜 60°C에서 1시간 방치한 후 xylene에서 5분씩 3회에 걸쳐 paraffin을 제거하였고, 100%, 95%, 70% ethanol, distilled water와 같이 알코올 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담가 함수과정을 거치게 하였다. 이후 hematoxylin과 eosin으로 이중염색과 periodic acid-Schiff (PAS)반응을 시킨 다음 탈수를 하였다. 합성수지 봉입제로 cover glass를 봉합한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan) 200배율로 관찰하고, 현미경이 부착된 카메라(DP70, Olympus,

Table 1. Composition of OF (*Opuntia ficus-indica* complex)

Component	%
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	65
<i>Trichosantes kirilowii</i> Maxim.	7
<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews	7
<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz	6
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	6
<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	6
<i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F. H. Chen	3

Japan)로 촬영을 하였다. 췌장의  $\beta$ -세포 숫자는 쥐 1마리당 무작위로 5개의 Langerhans' Islet을 선택하여 훈련된 3명의 사람이 세포 수를 세어 통계를 내었다.

### 7. 췌장 조직의 면역조직화학 염색

H&E 염색과 마찬가지로 paraffin을 제거한 일부 췌장 조직은 항원성 회복을 위하여 pressure cooker heating method를 적용하여 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)에서 10분간 끓여 주었고, 내인성 peroxidase의 저지를 위하여 3%  $H_2O_2$ 로 10분간 처리를 하고 2~3분간 수세하였으며, 비특이적 반응을 억제하기 위하여 10% goat serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 1차 항체(insulin AB-5; Lab Vision, USA, glucagon AB-1; Lab Vision, USA Ki-67; Lab Vision, USA)를 희석(insulin 1:1000, glucagon 1:100, Ki-67 1:200)하여 상온에서 30분간 결합시키고, TBS 용액으로 수세하였다. 이어서 효소 표지된 2차 항체를 30분간 반응시켜 결합시킨 후 TBS 용액으로 수세하였다.

DAB(3,3'-diaminobenzidine, Dako Cytomation, Denmark) 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후, 흐르는 물로 과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20초간 대조염색을 한 다음 흐르는 물로 과량의 염색시약을 제거하였다. 합성수지 봉입제로 cover glass를 봉합한 후 동일한 방법으로 검경하였고, 세포질이 뚜렷한 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하였으며, 세포 수는 H & E 염색 때와 동일한 방법으로 세었다.

### 8. Apoptosis

Apoptosis는 ApopTag<sup>®</sup>Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit(Chemicon<sup>®</sup>, USA & Canada)를 이용하여 수행하였다. 췌장 조직 절편을 동일한 방법으로 파라핀을 제거하고 합수과정을 거친 후 PBS에서 5분, proteinase K(20  $\mu$ g/ $\mu$ L, Sigma)에서 15분 동안 배양한 후 distilled water로 세척하고, 3%  $H_2O_2$ 에서 5분 동안 배양하여 endogenous peroxidase의 활성을 억제하였다.

Equilibration 완충액을 10초 이상 처리한 다음 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase) enzyme을 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. Stop 완충액을 처리한 다음 slide glass를 수세하고, DAB 발색시약을 5분 동안 처리한 다음 methyl green으로 10분간 대조염색을 하였다. 이어서 탈수과정을 거친 후 cover glass를 봉합하고, 면역조직화학염색과 동일한 방법으로 검경, 판정을 하여 세포수를 세었다.

### 9. 통계처리

본 실험연구에서 측정된 모든 수치들은 Mean $\pm$ S.E.로 나타

내었고, ANOVA를 한 다음, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 Statistical Analysis System(SAS)를 이용, Duncan's multiple range test를 실시하였고, 유의수준을 5% 수준에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 공복 시 혈당 및 당 부하 정도

Streptozotocin으로 당뇨를 유발한 당뇨 대조군의 혈당은 평균적으로 450 mg/dL를 나타냈고, 3주 동안 실험식을 급여한 쥐의 평균 공복혈당은 모든 실험군에서 당뇨를 유발하지 않은 정상군의 공복혈당인 100 mg/dL에 비하여 높게 나타났고 당뇨대조군의 공복혈당과 비교하였을 때 OF-2는 48%, OF-5는 65%의 유의적인 혈당 감소를 나타냈다( $p < 0.05$ , Fig. 1).

복합물들을 급여하였을 때 혈당 강하 효과에 관한 연구들을 살펴보면, Koh & Kim(2002)의 연구에서는 옥천산을 대조사료에 3% 수준으로 5주간 급여하여 혈당이 258 mg/dL로 대조군 277 mg/dL보다 낮았으나 유의성은 없었고, Yang *et al*(2004)의 연구에서는 수정로라는 복합물의 수증기 유출액을 50%와 100%로 6주 동안 음용하게 하여 290 mg/dL와 240 mg/dL로 42%와 50%의 혈당 강하 효과를 보였다. Ko YC(2003)의 연구에서는 상엽, 마치현, 옥미수, 산약, 산수유, 귀전우 및 지모 혼합물을 열수 추출하여 10주간 360 mg/kg/day의 농도로 급여하여 13.9%의 혈당 강하 효과를 확인했고, Park HR(2004)의 연구에서는 12주 후 당뇨대조군은 330 mg/dL, 상엽, 지황, 산약, 구기자 및 황기의 증류수를 150 mg/kg/day로 급여한 실험군에서는 224 mg/dL로 나타나, 공복 시 혈당

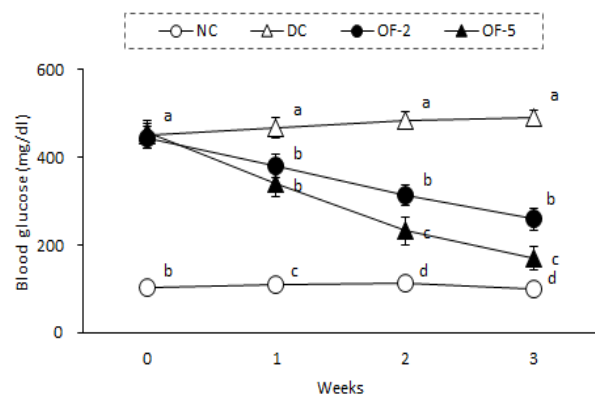


Fig. 1. Blood glucose levels in rats fed on experimental diets for 3 weeks.

Values are mean $\pm$ S.E.; n=8, NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-2%, OF-5: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-5%, Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test( $p < 0.05$ ).

이 170 mg/dL를 나타낸 OF의 혈당 강하 효과가 우수하다고 사료된다.

당내성 실험(glucose tolerance test, GTT)은 혈액 내 포도당이 세포 내로의 유입되는 능력을 측정하기 위한 실험으로, 정상군(NC)은 30분에 최고치의 혈당을 보였으나, 당뇨대조군은 60분에 최고치의 혈당을 나타냈으며, 완만한 혈당의 감소를 보였다. OF-2실험군과 OF-5실험군은 30분에 최고치의 혈당을 나타냈었다. 유의적( $p>0.05$ )인 차이를 보이며 급격하게 혈당이 감소되었고, 특히 OF-5는 정상군과 유사한 내당능을 보였다. 120분 후에는 공복혈당과 유사한 수준으로 혈당값의 감소를 나타냈다. 당뇨대조군은 조금 감소하기는 하였으나, 공복 혈당 수준만큼 낮아지지 못하였다( $p>0.05$ , Fig. 2).

Ko YC(2003)의 연구에서도 비슷한 경향을 보였는데, 당뇨대조군은 60분에 최고치를 나타냈고, 상업복합물을 급여한 실험군은 30분에 최고치를 나타냈으며, 전체적인 혈당치도 당뇨대조군보다 낮았고, 혈당 감소속도도 급격하게 이루어졌다. 또한, Yoon & Son(2009)은 다른 종류의 손바닥선인장류인 백년초선인장을 이용한 연구에서 본 연구 결과와 유사한 경향을 보고한 바 있다.

당뇨대조군은 당뇨로 인해 인슐린의 작용이 저하되어 당분해 능력이 저하됨으로써 분해 속도가 느려지는 것으로 해석되며, OF의 급여가 내당능을 회복시키는 작용이 있는 것으로 판단된다.

## 2. 혈장 인슐린 함량

혈장 인슐린함량은 Fig. 3에 제시한 바와 같이 정상군에 비하여 당뇨대조군에서 유의적인 감소를 보였으며, OF-2 급여시 당뇨대조군에 비하여 70%의 유의적인 증가를 보였고,

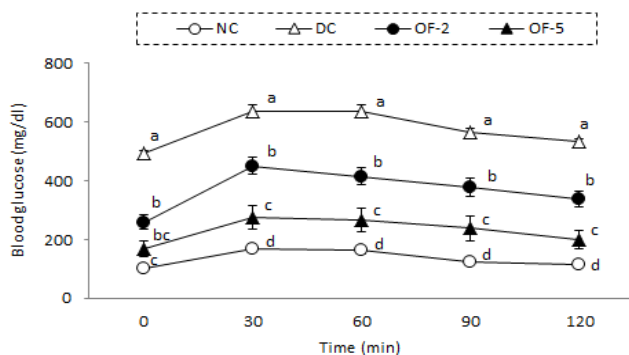


Fig. 2. Glucose tolerance test in control and diabetic rats fed on experimental diets for 3 weeks.

Values are mean±S.E.; n=8, NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-2%, OF-5: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-5%, Values with different letters at same time points are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

OF-5 급여시 당뇨대조군에 비하여 126%의 유의적인 증가를 보여 정상군과 비슷한 수준까지 높아졌다( $p<0.05$ ). Ko YC(2003)의 연구에서는 정상군 11.81 mg/dL, 당뇨대조군 3.3 mg/dL과 상업복합물의 열수추출물 급여군 6.23 mg/dL로 당뇨대조군과 비교해 2배 증가하였으나, 이는 정상군의 1/2에 불과하다. 이러한 OF의 인슐린농도 회복 수준은 다른 연구들(Latha *et al* 2004, Kasono *et al* 2004, Ko YC 2003)에서 보다 우수하였다.

$\beta$ -세포에서 포도당에 의한 인슐린 분비는 1차 분비와 2차 분비로 나누어지는 이상성 분비 양상을 나타낸다(Straub & Sharp 2002). 1차 분비는  $\beta$ -세포에 포도당 농도를 급격히 올렸을 때 인슐린분비가 일시적으로 급격히 상승하는 시기를 말하며, 대개 10분 내에 인슐린분비가 기저치로 회복된다. 제 2차 분비는 포도당 농도를 서서히 증가시킬 때 포도당에 노출된 이후 25분에서 30분 이후부터 약 4시간까지 점진적으로 인슐린분비가 이루어지는 시기이다(Curry *et al* 1968). 이러한 이상성 인슐린분비 양상은 인슐린낭의 구별된 pool의 존재와 포도당에 의해 활성화되는 신호들의 kinetics의 차이로 나타난다(Henquin *et al* 2003).

당대사에 관여하는 인슐린의 반감기는 약 6분 정도로 10~15분 내에 혈청에서 소멸되는데, 이 짧은 반감기의 특성이 인슐린 조절 기능을 신속하게 하며(Shepherd & Kahn 1999), 본 연구에서 OF급여 군에서 혈장 중 인슐린 농도가 높게 나타난 것은 STZ이 췌장 내 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포를 파괴하는 것을 완화하거나 파괴된  $\beta$ -세포를 회복시킨 결과일 것으로 추측된다.

## 3. 조직 관찰

췌장의 조직학적인 변화를 알아보기 위하여 조직학적 연구

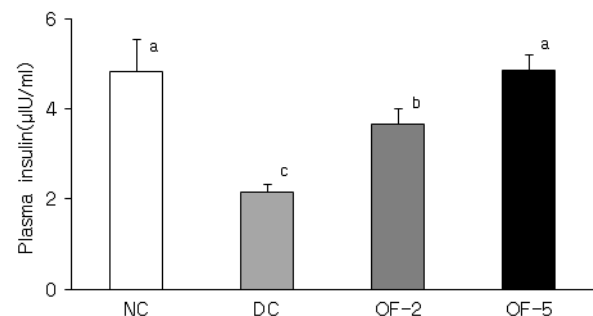


Fig. 3. Comparison of plasma insulin by supplementation of OF in rats for 3 weeks.

Values are mean±S.E.; n=8, NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-2%, OF-5: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-5%, Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

를 실시한 바, 각 실험군의 췌장 Langerhans' Islet을 H&E 염색한 결과, 세포의 수, 면역염색에 대한 세포의 수(%)와 apoptosis 세포의 수(%)는 Table 2에 나타내었다.

혈중 glucose 함량을 조절하며 당뇨병과 직접적인 관련이 있는 인슐린은 포유류의 췌장의 Langerhans' Islet 내에서 전반에 걸쳐 균등하게 분포하는데 반하여, 혈당을 상승시켜 인슐린과 반대 작용을 하는 glucagon은 포유류 췌장의 Langerhans' Islet 경계부분에 주로 분포한다(Erlandson *et al* 1976).

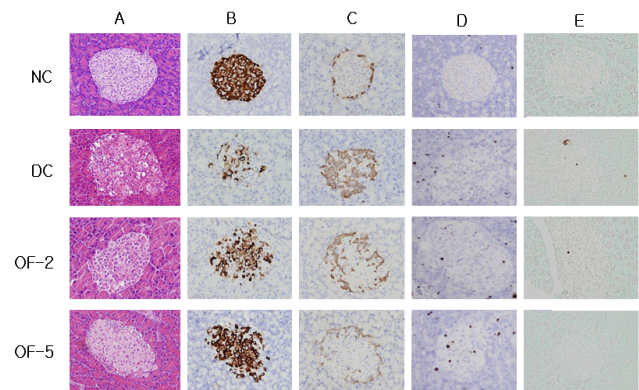
정상군의 췌장 Langerhans' Islet은 췌장에 산재성으로 분포하고 있었으며, 췌장의 외분비부와 뚜렷이 구분되어 있었다. 모양은 대부분 구형과 타원형으로 Langerhans' Islet을 구성하고 있는 세포는 세포밀도가 높으면서 균일하게 분포되어 있었으나, 당뇨병대조군에서는 Langerhans' Islet의 크기가 정상군에 비해 작았으며, 췌장외분비부와 뚜렷이 구분되어 있지 않았다. 모양도 구형이나 타원형이 아닌 불규칙한 형태를 나타내었고, 세포밀도는 낮았으며, 세포의 핵이 소실되고 피사하여 2차적인 공포변성이 관찰되었고, Islet 내에 결체조직 세포가 많이 증식하였음을 볼 수 있었다(Fig. 4A). 당뇨병대조군에서 관찰된 이러한 현상은 대부분이 STZ처리로 췌장 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포가 파괴됨으로써 일어나는 것이다(Wright & Lacy 1988, Gold *et al* 1981). 또한 STZ으로 당뇨가 유도된 경우, 산화반응이 활발해지고, 산화로 인해 Islet의  $\beta$ -세포가 파괴되고 형태가 불규칙한 모습으로 변한다(Ohkuwa *et al* 1995). OF-2와 OF-5 급여군에서는 당뇨병대조군과 뚜렷한 대조를 보였으며, Islet의 세포수가 유의적으로 증가하는 것을 보였다( $p < 0.05$ ).

인슐린 면역반응세포에 대하여 면역조직화학 염색을 실시한 결과(Fig. 4B) 정상군에서는 췌장 Islet의 전반에 걸쳐 진한 갈색으로 염색이 된 것을 확인할 수 있었으나, 당뇨병대조군의 경우에는 염색된 세포의 숫자가 유의적( $p < 0.05$ )으로 적었다. OF-2군과 OF-5군에서는 유의적( $p < 0.05$ )인 차이를 보이

면서 당뇨병대조군보다 많은 수의 염색된 세포수를 관찰할 수 있었으며, 특히 OF-5군은 정상군과 유사한 형태의 염색된 세포들의 분포를 확인할 수 있었다. 인슐린은 췌장 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포에서 분비되므로 인슐린 면역반응세포의 면역조직화학 염색 결과를 보면  $\beta$ -세포의 파괴 정도를 알 수 있다(Watanabe *et al* 2000).

췌장 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포가 파괴되면 파괴된 그 자리를  $\alpha$ -세포가 차지하여 Islet의 본래 용적을 유지하려는 현상을 보이므로  $\alpha$ -세포가 분비하는 glucagon의 양을 측정할 필요가 있다(Chae *et al* 2005, Rosenberg *et al* 2004). 따라서 glucagon 면역반응세포를 면역조직화학적으로 염색하여 그 함량 변화를 알아보려고 하였다.

Glucagon 면역반응세포에 대한 염색 결과를 보면(Fig. 4C),



**Fig. 4. Histopathological examination of pancreas from rats fed experimental diet for 3 weeks.**

NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-2%, OF-5: diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-5%, A: hematoxylin and eosin staining, B: anti-insulin antibody staining, C: anti-glucagon antibody staining, D: anti-Ki67 antibody staining of pancreas, E: apoptosis antibody staining, Original magnification: all  $\times 200$ .

**Table 2. Pancreatic islet in rats fed experimental diet for 3 weeks**

Items	H & E (cell no.) <sup>3)</sup>	Insulin (cell no.) <sup>3)</sup>	Glucagon (%) <sup>3)</sup>	Ki-67 (%) <sup>3)</sup>	Apoptosis (%) <sup>3)</sup>
NC <sup>2)</sup>	423.49 $\pm$ 10.94 <sup>1a)</sup>	160.77 $\pm$ 4.39 <sup>a)</sup>	20.10 $\pm$ 1.19 <sup>c)</sup>	0.51 $\pm$ 0.08 <sup>c)</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e)</sup>
DC <sup>2)</sup>	146.82 $\pm$ 7.51 <sup>c)</sup>	13.18 $\pm$ 1.01 <sup>d)</sup>	60.43 $\pm$ 1.93 <sup>a)</sup>	0.96 $\pm$ 0.10 <sup>b)</sup>	1.08 $\pm$ 0.11 <sup>a)</sup>
OF-2 <sup>2)</sup>	170.44 $\pm$ 8.29 <sup>c)</sup>	47.81 $\pm$ 0.92 <sup>cd)</sup>	35.86 $\pm$ 2.60 <sup>b)</sup>	1.23 $\pm$ 0.13 <sup>b)</sup>	0.23 $\pm$ 0.06 <sup>b)</sup>
OF-5 <sup>2)</sup>	210.94 $\pm$ 9.07 <sup>bc)</sup>	81.64 $\pm$ 2.80 <sup>b)</sup>	15.68 $\pm$ 0.40 <sup>c)</sup>	2.64 $\pm$ 0.16 <sup>a)</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e)</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean $\pm$ S.E., n=72.

<sup>2)</sup> NC, non-diabetic control; DC, diabetic control; OF-2, diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-2%; OF-5, diabetic *Opuntia ficus-indica* complex-5%.

<sup>3)</sup> H & E (hematoxylin & eosin, comparison of pancreatic islet cell number), Insulin (insulin-positive cell number), Glucagon (glucagon-positive cell ratio), Ki-67 (Ki-67-positive cell ratio), Apoptosis (apoptosis-positive cell ratio).

<sup>a-d)</sup> Values with different superscripts within same columns are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

정상군에서는 췌장 Langerhans' Islet의 경계부분만 진한 갈색의 염색을 확인할 수 있었으나, 당뇨대조군에서는 췌장 Langerhans' Islet의 경계부분과 중심부까지도 진한 갈색의 염색을 확인할 수 있었다. OF-2군과 OF-5군에서는 서로 유의적( $p<0.05$ )인 차이를 보이면서 당뇨대조군보다 적은 수의 염색된 세포수를 관찰할 수 있었고, 특히 OF-5군은 정상군과 유사한 수준까지 염색된 세포수가 감소하였다.

Ki-67은 세포의 증식을 알아보기 위한 염색방법으로 Ki-67 함량은 세포성장과 관련이 있으며, 또한 세포의 잠재력을 판단할 기준이 될 수 있다(Scholzen & Gerdes 2000). Ki-67 면역반응세포의 면역조직화학 염색 결과는 Fig. 4D와 같다. 정상군에서는 Ki-67 면역반응을 보이는 세포가 거의 없었으며, 당뇨대조군에서는 정상군보다 Ki-67 면역반응을 보이는 세포가 많았으며, OF-2군에서는 당뇨대조군과 비슷한 수준을 나타내었고, OF-5군에서는 당뇨대조군보다 높은 수준을 나타내었다( $p<0.05$ ).

Apoptosis는 세포의 자멸을 나타내는 것으로, STZ에 의한 췌장의 Langerhans' Islet 세포의 자멸(apoptosis)과 괴사(necrosis)를 규명하기 위하여 apoptosis detection kit를 사용하여 면역조직화학 염색을 실시하였으나, 그 결과는 Fig. 4E에 제시된 바와 같다. 정상군에서는 apoptosis를 관찰할 수 없었으나, 당뇨대조군에서는 정상군과 유의적인 차이를 보이면서 apoptosis가 증가되었다( $p<0.05$ ). OF-2군에서는 당뇨대조군보다는 낮은 수였으나, 정상군 보다는 높은 수를 나타내었으며( $p<0.05$ ), OF-5군에서는 apoptosis가 관찰되지 않았다. STZ은 산화적인 스트레스를 유발하며(Schmezer *et al* 1994), 당뇨병에서의 산화적 스트레스는  $\beta$ -세포의 apoptosis와 사멸을 초래한다(Sandhya *et al* 2000).

지금까지 면역염색을 통해 췌장조직을 관찰한 결과를 보면 OF의 급여가 STZ에 의한 췌장 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포의 파괴를 감소시키고,  $\beta$ -세포의 생성을 도와 I형 당뇨에 효과를 보이는 것으로 판단된다.

## 요 약

손바닥선인장의 한 종류인 노팔(*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill)을 주재료로 하여 제조한 복합물(OF)의 항당뇨 효과를 알아보기 위해 8주령 수컷 SD-rat에게 streptozotocin을 주사하여 당뇨를 유발하고, 사료에 OF를 첨가하여 3주간 급여하였으며, 1주일 간격으로 공복 시 혈당을, 3주 후에는 당내성과 혈장 인슐린 농도를 측정하고 췌장 조직에 면역조직화학 염색을 실시하였다. 실험동물은 정상 대조군(NC), 당뇨 대조군(DC), 2% OF 급여군(OF-2), 5% OF 급여군(OF-5)으로 구분되었으며, NC와 DC는 기초식이, OF-2와 OF-5는 기초식에 각각 2%와 5%의 OF를 섞어서 급여하였다. 실험 개시 후

1주마다 12시간 절식시켜 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 공복 혈당을 측정하였다. 실험 3주 후 12시간을 절식시켜 glucose(50 mg/kg BW)를 복강주사한 다음, 30, 60, 90, 120분 경과 후에 혈당을 측정하여 당내성을 측정하였고, 심장에서 혈액을 채취하여 혈중 인슐린 함량을 분석하였다. 또한 췌장 조직에 대해 면역조직화학 염색을 실시하여 조직학적인 변화를 알아보았다. 3주간의 공복 시 혈당은 OF-5와 OF-2 모두 유의적으로 감소하였다( $p<0.05$ ). 당내성 측정 결과, OF 급여군은 DC와는 달리 혈당 농도의 변화 추이가 NC와 유사하였으며, 특히 OF-5는 OF-2에 비해서도 혈당 강하 효과가 높았던 것으로 드러났다. 췌장 조직의 면역염색에 의하면, OF의 혈당강하 기작은 췌장 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포를 생성시키고,  $\beta$ -세포의 사멸을 억제시켜 인슐린의 분비를 정상화시키는 것이었으며, 이러한 결과는 혈장 인슐린 함량의 증가로 재확인할 수 있었다. 결론적으로 OF는 I형 당뇨에서 현저한 혈당 강하 효과 및 Langerhans' Islet의  $\beta$ -세포수를 회복시켜줌으로써 I형 당뇨의 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

노팔천연복합물(OF)을 제조해주신 Dr. 정에게 감사드립니다.

## 문 헌

- Annida B, Prince PSM (2004) Supplementation of fenugreek leaves lower lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 7: 153-156.
- Bailey CJ, Day C (1989) Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-564.
- Chae HY, Lee BW, Oh SH, Ahn YR, Chung JH, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW (2005) Effective glycemic control achieved by transporting non-viral cationic liposome-mediated VEGF-transfected islets in streptozotocin-induced diabetic mice. *Exp Mol Med* 37: 513-523.
- Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM (1968) Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83: 572-584.
- DeFronzo RA (1981) The effect of insulin on renal sodium metabolism. *Diabetologia* 21: 165-171.
- Desbuquois B, Aurbach GB (1971) Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 732-738.
- Erlanson SL, Hegre OD, Parsons JA, McEvoy RC, Elde RT (1976) Pancreatic islets cell hormones distribution of cell

- types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cells. *J Histochem Cytochem* 24: 883-897.
- Falhot K, Cutfield R, Alejandro R, Heding L, Mintz D (1985) The effect of hyperinulinemia on arterial wall and peripheral muscle metabolism in dogs. *Metabolism* 34: 1146-1149.
- Gold G, Manning M, Heldt A, Nowlain R, Pettit JR, Grodsky GM (1981) Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin: lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes* 30: 634-638.
- Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P (2003) Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest Review* 33: 742-750.
- Koh JB, Kim JY (2002) Effect of Okcheonsan on blood glucose, lipid and protein levels in streptozotocin-induced diabetic female rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 284-289.
- Lim SJ, Choi SS (1997) The effect of *Tricosanthes kiliouii* Max. subfractions on the insulin activity in streptozotocin induced diabetic rats and their acute toxicity. *Korean J Nutr* 30: 25-31.
- Lozoya M (1989) Hypoglycaemic activity of *Opuntia streptocantha* throughout its annual cycle. *Am J Chin Med* 17: 221-224.
- Moon YI (2004) Studies on cultural practices, composition and functional effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Ph D Dissertation* Jeju National University, Jeju. p 53.
- Sandhya SL, Shewade Y, Bhonde R (2000) Role of bittergourd fruit juice in STZ-induced diabetic state *in vivo* and *in vitro*. *J Ethnopharmacol* 73: 71-79.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322.
- Shepherd P, Kahn BB (1999) Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med* 341: 248-257.
- Steiner G, Haynes F, Yoshino G, Vranic M (1984) Hyperinulinemia and *in vivo* very-low-density lipoprotein triglyceride kinetics. *Am J Physiol* 246: 187-192.
- Straub SG, Sharp GW (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metb Res Rev* 18: 451-463.
- Watanabe H, Sumi S, Urushihata T, Kitamura Y, Iwasaki S, Xu G, Yano S, Nio Y, Tamura K (2000) Immunohistochemical studies on vascular endothelial growth factor and platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD-31 in islet trans plantation. *Pancreas* 21: 165-173.
- Wright JR, Lacy PE (1988) Synergistic effects of adjuvants, endotoxin, and fasting on induction of diabetes with multiple low doses of streptozotocin in rats. *Diabetes* 37: 112-118.
- Xie JT, Aung HH, Wu JA, Attel AS, Yuan CS (2002) Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in ob/ob mice. *Am J Clin Med* 30: 187-194.
- Yang SM, Shon MY, Sung NJ (2004) Effects of Sujungro on blood glucose and lipid level in streptozotocin-diabetic rats. *Food Industry and Nutrition* 9: 40-44.
- Yoon JA (2007) Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes on blood glucose and lipid metabolism in animal model of type I and type II diabetes. *Ph D Dissertation* Korea University, Seoul. p 1.
- Yoon JA, Son YS (2009) Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes B(OCB) on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food & Nutr* 22: 48-56.
- Young IR, Stout RW (1987) Effects of insulin and glucose on the cells of the arterial wall: Interaction of insulin with dibutyryl cyclic AMP and low density lipoprotein in arterial cells. *Diabete Metab* 13: 301-306.
- Zhang R, Zhou J, Jia Z, Zhang Y, Gu G (2004) Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide and alloxan induced diabetic rats and its mechanism. *J Ethnopharmacol* 90: 39-43.

---

집 수: 2012년 2월 29일  
 최종수정: 2012년 6월 26일  
 채 택: 2012년 6월 27일