

## 補氣除痛湯이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨병성 말초신경병증 동물 모델에 미치는 영향

이종빈, 김철중, 조충식

대전대학교 부속 천안한방병원 신계내과학교실

### Effects of Bogijetong-Tang on Diabetic-peripheral Neuropathy Induced by Streptozotocin in the Mouse

Lee Jong bin, Kim Chul Jung, Cho Chung Sik

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

**Objectives:** Previous reports have shown that Bogijetong-Tang (BJT) is effective in peripheral neuropathy induced by taxol and crush injury. In this study, we researched the effects of BJT on diabetic neuropathy induced by STZ in the mouse.

**Methods:** We performed both in vitro and in vivo experiments to verify the effects of BJT on diabetic neuropathy induced by STZ in mice. Changes in axonal recovery were observed with immunofluorescence staining using NF-200, Hoechst33258, S100 $\beta$ , caspase 3 and anti-cdc2. Proliferation and degeneration of Schwann cells were investigated by immunofluorescence staining and western blot analyses.

**Results:** BJT showed considerable effects on neurite outgrowth and axonal regeneration in diabetic neuropathy. BJT contributed to the creation of NF-200, GAP-43, Cdc2, phospho-vimentin,  $\beta$ 1, active  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 integrin, phospho-Erk1/2 protein.

**Conclusions:** Through this study, we found that BJT is effective for enhanced axonal regeneration via dynamic regulation of regeneration-associated proteins. Therefore, BJT had a pharmaceutical property enhancing recovery of peripheral nerves induced by diabetic neuropathy and could be a candidate for drug development after more research.

*Key Words* : Diabetic-peripheral neuropathy, Bogijetong-Tang (BJT), sciatic nerve, Schwann cell, dorsal root ganglia

### 서론

당뇨병성 신경병증(diabetic neuropathy)은 당뇨병의 만성합병증 중 가장 흔한 미세혈관 합병증으로 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신병증과 더불어 당뇨병의 3대 합병증이다<sup>1,2)</sup>.

당뇨병성 신경병증의 특징은 말초 신경섬유가 점

차 소실되어 사지의 통증이나 감각소실, 신경병증성 궤양과 절단이 이뤄지고, 신경기능의 이상으로 온도 감각, 진동각, 건반사, 신경전도 속도 등이 감소된다는 점이다<sup>3)</sup>.

당뇨병성 신경병증을 일으키는 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나 일반적으로 고혈당으로 인한 단백질 비활성화에 의한 신경 전달 장애<sup>4,5)</sup>, 신경

• Received : 14 July 2013

• Revised : 27 August 2013

• Accepted : 16 September 2013

• Correspondence to : 조충식(Cho Chung Sik)

충남 천안시 서북구 두정동 421번지 대전대학교 부속 천안한방병원 신계내과학교실

Tel : +82-41-521-8531, Fax : +82-41-521-7007, E-mail : choolo2@chol.com

조직의 Na-K ATPase의 활성 감소<sup>6)</sup>, 말초혈관장애에 의한 신경 경색 및 신경위축<sup>7)</sup> 등이 제시되고 있다.

당뇨병성 신경병증의 기저질환인 당뇨병은 전체 환자의 3.8%, 만성질환 환자의 24%를 차지하고, 이에 따라 당뇨병성 신경병증의 청구건수나 진료비도 상승<sup>8)</sup>하고 있지만 치료는 철저한 혈당 조절과 더불어 삼환계 항우울제나 항경련제 투여 등 대증 치료에 불과한 실정이다<sup>1,8)</sup>.

최근 신경 재생에 중요한 역할을 하는 슈만세포를 이용하여 신경성장인자의 분비를 유도시켜 신경병증을 치료하려는 연구가 시도되고<sup>9)</sup>, 당뇨병성 신경병증 기전에 기초한 치료로 알도스 환원효소 억제제 등이 사용되고 있다<sup>10)</sup>. 그러나 아직까지 당뇨병성 신경병증의 병인이 명확하게 규명되지 않았고, 기전에 있어서도 여러 가지 대사가 복합적으로 작용하며 이루어지기 때문에 진단과 치료가 쉽지 않다<sup>10)</sup>. 이러한 배경으로 인해 당뇨병성 신경병증에 대한 한의학적 연구가 더욱 요구되며, 실제로 최근 한약물의 당뇨병성 신경병증에 대한 임상적 효과가 보고되었다<sup>11-16)</sup>.

본 연구에서 사용된 補氣除痛湯(이하 BJT)<sup>17)</sup>은 임상적 연구에서 당뇨병성 말초신경병증 환자에게서 증상개선 효과가 있었고, 실험적 연구에서 압좌 및

항암제로 인한 말초신경병증 모델에 효과가 있다는 보고가 있다<sup>18)</sup>. 그러나 아직까지 당뇨병성 신경병증에 대한 BJT의 실험연구는 없었다.

이에 저자는 streptozotocin(이하 STZ)으로 유발된 당뇨병성 말초 신경병증 동물 모델과 포도당 독성을 이용한 세포에 BJT를 투여하여 phospho-Erk1/2, Cdc2, phospho-vimentin, β-integrin, phospho-Smad, NF-200, GAP-43을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 albino ICR 계열의 7주령 수컷 mouse를 (주)대한바이오링크에서 구입하였으며, 고휘 사료(Samyang Co. Korea)와 물을 제약 없이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22-24°C, 습도는 50±10%가 유지되도록 하고, 조명은 밤낮 주기(12시간 주/야)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다. 본 실험은 대전대학교 동물 실험 윤리 규정을 준수하여 시행하였다.

Table 1. Prescription of Bogijetong-tang(BJT)

Scientific name	Amount (g)
<i>Astragali Radix</i>	30
<i>Ginseng Radix</i>	4
<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	7.5
<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	10
<i>Cnidii Rhizoma</i>	5
<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	7.5
<i>Salviae Multiorrhizae Radix</i>	12
<i>Persicae Semen</i>	7.5
<i>Carthami Flos</i>	7.5
<i>Spatholobi Caulis</i>	12
<i>Epimedii Herba</i>	10
<i>Lumbricus</i>	5
<i>Puerariae Radix</i>	8
<i>Cibotii Rhizoma</i>	8
<i>Albiziae Cortex</i>	12
<i>Uncariae Ramulus et Uncus</i>	12
<i>Chaenomelis Fructus</i>	8
<i>Ostrae Concha</i>	12
Total amount	178

## 2) 약제

한약에 증류수 1,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 가열하여 얻은 액을 여과하였다. 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, Eyla FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물을 냉동 (-84°C) 보관하면서 생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 초기 한약재 178 g 으로부터 24.04g의 추출물을 얻어 16%의 수율을 나타내었다.

본 실험에 사용한 BJT 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1). 약재는 (주)옴니허브(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

## 3) 시약

Neurofilament 200 (Sigma, USA), p-vimentin (MBL, Japan), cleaved caspase 3 (Cell Signaling, USA), fluorescein goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA), rhodamine red-X goat anti-rabbit IgG (Invitrogen), Hoechst 33258 (Invitrogen), polyclonal anti-cdc2 (Santa Cruz Biotechnology, USA), phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody (Cell Signaling, USA), GAP-43 (Santa Cruz Biotechnology, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA), goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA), p-Smad (Santa Cruz Biotechnology, USA), Smad (Santa Cruz Biotechnology, USA),  $\beta$ 1 integrin (Santa Cruz Biotechnology, USA),  $\beta$ 3 integrin (Santa Cruz Biotechnology, USA), active form  $\beta$ 1 integrin (BD Bioscience, USA) 등을 사용하였다.

## 4) 기기

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기(DaeWoong, Korea), thermo bath(ALB64, HanYoung, Korea), 초음파분쇄기(model 100, Fisher scientific, USA), 원심분리기(Micro 17TR, Hanil, Korea), 전기영동장치(80-6147-45, Amersham, USA), transfer unit(TE70, Amersham, USA), electrophoresis power supply(EPS 301, Amersham, USA), cryostat(CM 1850, LEICA, Germany), 형광현미경(Nikon DXM 1200F, Japan)

등 이다.

## 2. 방법

### 1) In vitro 실험

#### (1) 실험 세포 모델 확립

① Normal군 ② glucose(30mM)와 식염수 처리한 control군(이하 control군) ③ glucose (30mM)와 BJT(0.3mg/ml) 처리한 BJT0.3군(이하 BJT0.3군) ④ glucose(30mM)와 BJT(0.5mg/ml) 처리한 BJT0.5군(이하 BJT0.5군) 으로 나누어 진행하였다.

#### (2) Dorsal root ganglia (DRG) 배양

본 신경 조직 세포배양에 대한 일반적 방법 및 원리는 Banker 와 Goslin의 실험서<sup>19)</sup>를 참조하였다. 유리 coverslip을 poly-L-ornithine (0.1mg/ml, Sigma, USA)과 laminin (0.02mg/ml, Collaborate research, USA)을 혼합하여 실온에서 pre-coating 하였다. 수반 세포와 DRG sensory neuron을 배양하기 위해, mouse의 좌골신경과 요추 4-6에서 DRG sensory neuron을 분리하여 ice-cold BME medium (Gibco, USA)에 넣었다. 분리한 좌골신경과 DRG sensory neuron은 type XI collagenase (2500U/ml, Sigma, USA)를 포함한 BME를 처리하여 37°C에서 90분 동안 처리하였다. 조직을 BME으로 세척한 후 상층액을 제거하기 위해 3,000rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 다시 한 번 세척 후 세포를 BME에 녹여서 화염 멸균한 Pasteur pipette을 16-20번 통과하여 분리시키고 상층액을 제거하기 위해 3,000rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. Cell은 type SII trypsin (0.5mg/ml)을 포함한 BME를 15분간 처리 후 trypsin inhibitor (100mg/ml), EDTA (1mM) and DNase I (80mg/ml)을 포함한 BME로 5분간 처리하였다. 배양배지 (5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 5% horse serum, 2 mM glutamine and 1% penicillin-str eptomycin을 포함한 BME)로 세척한 DRG sensory neuron (1.5x10<sup>2</sup> cells neuron)을 12mm round coverslip 위에 plating 하고 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간동안 배양한 뒤 새로운 배지로 갈아주었다. 본 배양 DRG sensory neuron을 24시간 배양하고, glucose (30mM)를 처리한 후 24시간 후

면역형광분석을 위하여 세포를 고정하였다.

### (3) 면역형광염색

배양한 cerebella neuron과 DRG sensory neuron에 대해 이중 면역형광 염색법(double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 고정하였다. 이후의 실험 과정은 in vitro 실험과정과 동일하였다. 본 실험에 사용한 일차항체는 Neurofilament 200 (1:400, Sigma, USA)와 S-100 $\beta$  (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA)이었다.

### (4) Neurite outgrowth 측정

NF-200으로 염색한 neuron을 i-solution 프로그램을 이용하여 neurite 길이를 측정하였다.

### (5) 조직 sample의 현미경 분석

면역형광조직은 Nikon 형광현미경을 이용하여 분석한 후 현미경에 부착된 디지털 카메라로 이미지를 포착하여 ACT-1 software를 이용하여 분석하였다. 중첩 이미지는 Photoshop 프로그램 상의 image blend 모드를 이용하여 분석하였다.

## 2) In vivo 실험

### (1) 실험동물 모델 확립

① normal군 ② STZ(200mg/kg)와 생리식염수 처리 control군(이하 control군) ③ STZ(200mg/kg)와 BJT(400mg/kg) 투여군(이하 BJT군)으로 나누어 진행하였다. 공복 6시간 후 STZ를 복강 주사하여, 1주일 후 혈당수치 200mg/dl 이상인 경우를 당뇨가 유발된 것으로 보았으며, BJT를 1회/일, 7일간 구강 투여하였다. 각 군별 사용된 mouse는 4마리였다.

### (2) 면역형광염색

분리한 sciatic nerve는 -20°C에서 냉동시킨 후 cryostat를 이용하여 20  $\mu$ m의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 이중 면역형광 염색법 (double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 4% paraformaldehyde, 4% sucrose가 혼합된 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS)에 45분 동안 슬라이

드를 넣어 고정하였다. 비 특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 1:400의 비율로 혼합하여 처리한 후 실온에서 4시간 동안 반응시킨다. 일차항체 반응이 끝난 후 PBST (PBS plus 0.1% triton X-100)로 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse (green)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody (Molecular probes)를 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 이차항체 처리를 수행하였다. 이차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 PBST로 세척을 수행하였다. Hoechst 33258 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 이차 항체는 빛에 민감하기 때문에 반응 시간동안 반드시 암실에서 수행하였다. 모든 조직 sample은 형광현미경 (Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰되어지고, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop(version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 증폭시켜 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 일차항체는 caspase-3 (1:500, Cell signaling), Neurofilament 200 (1:400, Sigma), phospho-p44/42 Erk1/2 (1:400, Cell signaling, USA), anti-Cdc2 (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA), p-vimentin (1:400, MBL, Japan), GAP-43 (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA), active form  $\beta$ 1 (1:400, BD Bioscience, USA),  $\beta$ 1-integrin (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA),  $\beta$ 3-integrin (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA)와 p-Smad (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA) 이었다.

### (3) Western blot 분석

(i) normal군, (ii) control군 (iii) BJT군에서 분리한 sciatic nerve는 triton lysis buffer (20mM Tris, pH 7.4, 137mM NaCl, 25mM  $\beta$ -glycerophosphate, pH 7.14, 2mM sodium pyrophosphate, 2mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 $\mu$ g

/ml leupeptin, 5µg/ml aprotinin, 2µm benzamidine, 0.5mM DTT, 1mM PMSF)에 담가 초음파 분해하였다. 그 다음 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10µg 단백질을 western blot 분석에 사용하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel (1.5M Trisma base, 10% sodium dodecyl sulfate, 30% acrylamide, 10% ammonium sulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비 특이적 결합을 막기 위해 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA), 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고 4°C에서 16시간 동안 blocking buffer 상에서 반응을 진행하였다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 1차 항체를 blocking buffer (1 × TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 정해진 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 membrane을 씻어내고 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA) 또는 anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:2000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리 하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak Scientific Imaging Film (Eastman Kodak Co., USA)에 감광 하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 phospho-p44/42 Erk1/2 kinase antibody (1:4,000, Cell Signaling, USA), monoclonal anti-Cdc2 (1:2,000, Santa Cruz Biotechnology, USA), monoclonal phospho-vimentin (1:2,000, MBL, Japan), p-Smad (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), active form β1 integrin (1:1000, BD Bioscience, USA), β3 integrin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), polyclonal β1 integrin (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, USA), GAP43 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, USA)등 이었다.

### 3) 통계분석

실험 집단 간 수치 데이터는 mean+SE로 기록하였고, one-way A NOVA에 의해 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다. 통계

분석은 SPSS ver. 12를 이용하였다.

## 결 과

### 1. 배양신경세포의 형태적 변화에 미치는 영향

#### 1) 신경세포의 축삭돌기 성장 변화에 미치는 영향

면역형광염색에서 control군은 normal군(268.4±3.1)에 비해 축삭돌기가 156.3±17.9(p<0.001)로 유의성 있게 감소하였고, BJT0.3군에서는 198±11.7 (p<0.05), BJT0.5군에서는 238.2±12.2(p<0.01)로 control군에 비하여 축삭돌기가 유의하게 증가되었으며(Fig. 1A), 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1B).

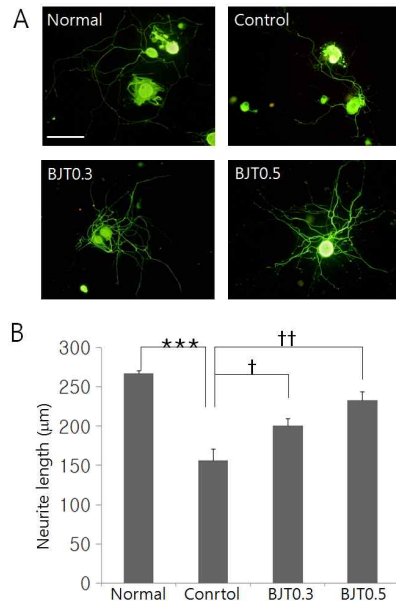


Fig. 1. Pattern of neurite outgrowth of cultured DRG neurons.

DRG sensory neurons were treated with glucose and BJT at 0.3mg/ml or 0.5mg/ml for 24hr. Cells were visualized by immunofluorescence staining for NF-200 protein (blue). (A) Representative images of immunostained cells. (B) Quantification of neurite outgrowth. n=4 \*\*\*:p<0.001(vs normal group) †: p<0.05, ††: p<0.01(vs control group). Scale bar in (A): 50 µm. Normal : non-treated group. Control : glucose(30mM) + saline BJT0.3 : glucose(30mM) + BJT(0.3mg/ml) BJT0.5 : glucose(30mM) + BJT(0.5mg/ml)

2) Hoechst 33258 염색 NF-200을 통한 신경세포와 비신경세포 분포 분석

Control군의 경우 비신경세포의 핵이 신경세포와 일부만이 인접하였다. 반 BJT군에서는 축삭돌기 성장의 개선을 나타내었다. 또한, BJT군에서는 비신경세포의 핵 대부분이 신경세포와 상당히 근접하여 있었다.

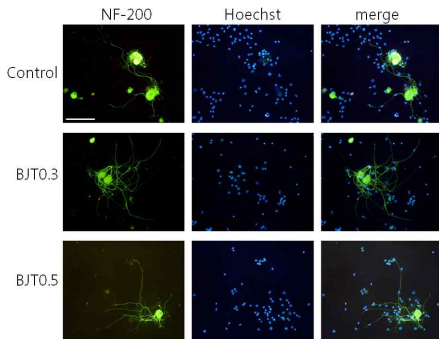


Fig. 2. Distribution of DRG neurons and non-neuronal cells of cultured DRG tissue.

Cultured DRG cells including sensory neurons and non-neuronal cells were identified by NF-200 immunostaining (green) and Hoechst nuclear staining (blue). Merged images show their proximity in distribution in culture. Scale bar: 50 $\mu$ m.

Control : glucose(30mM) + saline  
 BJT0.3 : glucose(30mM) + BJT(0.3mg/ml)  
 BJT0.5 : glucose(30mM) + BJT(0.5mg/ml)

2. 말초신경의 반응성에 미치는 영향

1) 축삭의 재생반응성 지표물질에 미치는 영향

(1) NF-200에 미치는 영향

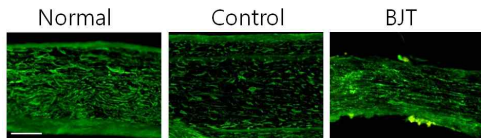


Fig. 3. Immunofluorescence staining analysis of NF-200 protein signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for NF-200 protein (in green).

Scale bar: 200 $\mu$ m.

Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

Normal군에서는 종단방향의 축삭가지들이 뚜렷이 관찰되었으나 control군에서는 NF-200에 대한 염색수준이 감소하였다(Fig. 3). BJT군에서는 축삭들이 control군과 유사한 형태로 다시 회복되는 양상을 나타내었다.

(2) GAP-43에 미치는 영향

Normal군과 control군에서는 GAP-43 단백질이 관찰되지 않았지만, BJT군에서 GAP-43은 뚜렷하게 생성되었다(Fig. 4).

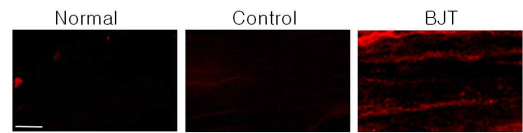


Fig. 4. Immunofluorescence staining analysis of GAP-43 protein signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for GAP-43 protein (in red).

Scale bar: 200 $\mu$ m.

Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(3) Western blot 분석에 의한 GAP-43에 미치는 영향

Normal군에서 GAP-43 단백질은 전혀 관찰되지 않았으나, control군에서는 약한 밴드가 관찰되고, BJT군에서는 단백질 수준이 control군에 비하여 증가하였다(Fig. 5).

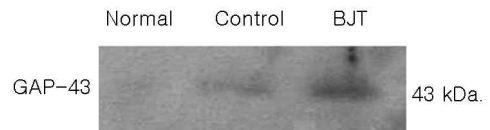


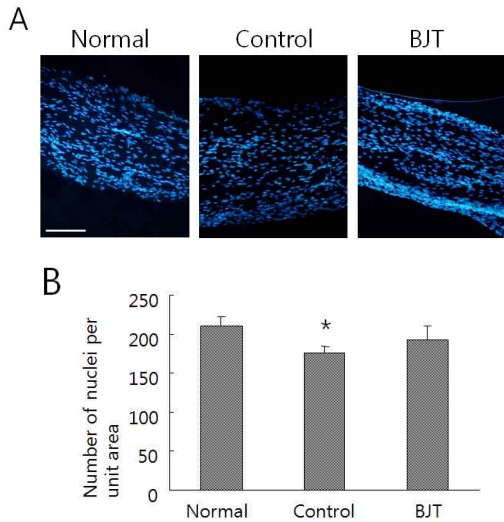
Fig. 5. Western blot analysis of GAP-43 in protein samples from the sciatic nerves after different treatments.

GAP-43 protein was identified as a single band at 43 kDa.

Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(4) 슈반세포에 미치는 영향

각 실험군 간에 세포핵 형태는 차이를 나타내지 않았으나 단위면적당 세포수치에 있어서는 normal군(212.3±11.2)보다 control군(173.4±9.6)에서 유의하게 감소하였다(p<0.05). 이에 반해, BJT군(192.8±16.9)은 control군에 비하여 세포핵 수치가 증가하였지만 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6).



**Fig. 6.** Hoechst nuclear staining of sciatic nerve sections. Longitudinal nerve sections were used for Hoechst nuclear staining, and individual nuclei were detected (in blue).

(A) Representative images in nerve sections for individual experimental groups. (B) Quantitative comparison of the number of nuclei among individual experimental groups. n=4, error bar: SEM. \*P<0.05, compared to normal group. Scale bar in (A): 200µm.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

2) Cdc2 신호경로 관련인자에 미치는 영향

(1) Western blot 분석에 의한 Cdc2에 미치는 영향

Cdc2는 normal군에서 관찰되지 않았으며 control군에서 약한 수준의 유도양상을 나타내었고, BJT군에서는 control군에 비하여 Cdc2 단백질 수준은 더욱 증가하였다(Fig. 7).

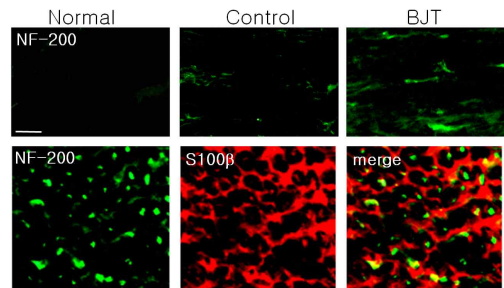


**Fig. 7.** Western blot analysis of Cdc2 in protein samples from the sciatic nerves after different treatments.

Cdc2 protein was identified as a single band at 34 kDa.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(2) 면역형광염색 분석에 의한 Cdc2 및 S100β에 미치는 영향

Normal군에서 Cdc2 단백질은 전혀 탐지되지 않았으며, control군에서 약한 수준의 생성을 나타내었다(Fig. 8A). BJT군에서는 control군보다 추가적으로 증가되었다. 좌골신경 조직을 횡단으로 절단 후 Cdc2 단백질과 슈반세포의 지표단백질인 S100β에 대한 이중면역형광염색 분석을 실시한 결과 Cdc2 단백질 신호는 S100β의 신호를 나타내는 세포에서 모두 탐지되었다(Fig. 8B).



**Fig. 8.** Immunofluorescence staining analysis of Cdc2 protein signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining. (A) Representative fluorescence views for NF-200 protein (green). (B) Double immunofluorescence staining of Cdc2 and S100β protein signals. Transverse nerve sections from the injured sciatic nerves were used to examine colocalization of two proteins. Scale bars in (A) and (B): 100µm.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(3) Western blot 분석에 의한 phospho-vimentin에 미치는 영향

Phospho-vimentin 단백질은 normal군에서는 전혀 생성되지 않았으며 control군에서 단백질이 뚜렷하게 확인되었다. BJT군은 control군에 비하여 phospho-vimentin 단백질 생성이 증가하였다(Fig. 9).

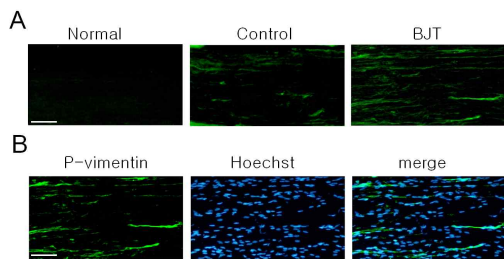


**Fig. 9.** Western blot analysis of phospho-vimentin in protein samples from the sciatic nerves after different treatments. Phospho-vimentin was identified as a single band at 57 kDa.

Normal : non-treated group.  
Control : STZ(200mg/kg) + saline  
BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(4) 면역형광염색 분석에 의한 phospho-vimentin의 조직 분포에 미치는 영향

Phospho-vimentin 단백질 신호는 normal군에서 전혀 탐지되지 않았으며 control군에서 약한 수준으로 증가하였다(Fig. 10A). 이에 반해, BJT군에서 생성이 강하게 증가하였다. BJT군에서 phospho-vimentin 단백질을 Hoechst 핵 염색 이미지와 중첩 후 관찰한 결과 긴 섬유상 형태로 강한



**Fig. 10.** Immunofluorescence staining analysis of phospho-vimentin signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for phospho-vimentin (in green). (A) Representative fluorescence staining images. (B) Merged images of phospho-vimentin with Hoechst-stained nuclei. Scale bar in (A, B): 100 $\mu$ m.

Normal : non-treated group.  
Control : STZ(200mg/kg) + saline  
BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

단백질 신호를 나타내었으며, 핵 염색부위에 중첩되는 양상의 분포를 나타내었다(Fig. 10B).

3) Phospho-Erk 단백질 관련인자에 미치는 영향

(1) Western blot 분석에 의한 Phospho-Erk1/2에 미치는 영향

Normal군에서 phospho-Erk1/2는 전혀 탐지되지 않았으며, control군에서도 마찬가지로 phospho-Erk1/2는 거의 관찰되지 않았다. 이에 반해, BJT군에서는 control군에 비하여 phospho-Erk1/2가 강하게 생성되었다(Fig. 11).



**Fig. 11.** Western blot analysis of phospho-Erk1/2 in protein samples from the sciatic nerves after different treatments

Phospho-Erk1/2 was identified as double bands at 42 and 44kDa (arrows).

Normal : non-treated group.  
Control : STZ(200mg/kg) + saline  
BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

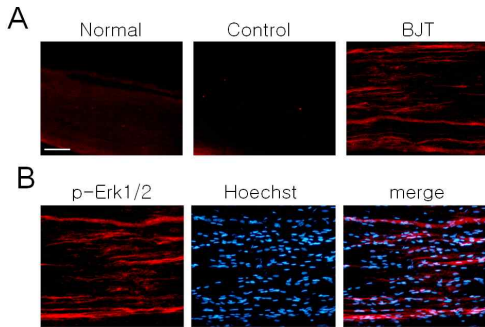
(2) 면역형광염색 분석에 의한 Phospho-Erk1/2의 조직 분포에 미치는 영향

Normal군과 control군의 좌골 신경상에서는 phospho-Erk1/2는 검출되지 않았으며, BJT군에서 조직상에 뚜렷한 단백질 신호를 나타내었다(Fig. 12A). BJT군의 좌골신경 조직에 대해 phospho-Erk1/2 단백질과 Hoechst 염색 이미지를 중첩한 결과, phospho-Erk1/2의 띠 형태 부분은 핵 염색 부위에 대부분 중첩되었다. 다만, 일부 phospho-Erk1/2 신호는 비핵 염색부위에서 관찰되었다(Fig. 12B).

(3) Phospho-Erk1/2와 phospho-vimentin 단백질 신호의 중첩성에 미치는 영향

Phospho-Erk1/2의 뚜렷한 단백질 신호를 나타내는 BJT군에서 신경조직에 대해 phospho-vimentin 단백질 신호와 중첩성 여부를 관찰하기

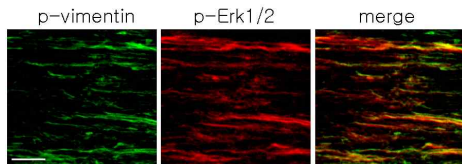




**Fig. 12.** Immunofluorescence staining analysis of phospho-Erk1/2 signals in the longitudinal sciatic nerve sections

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for phospho-Erk1/2 (in red). (A) Representative fluorescence staining images. (B) Merged images of phospho-Erk1/2 with Hoechst-stained nuclei. Scale bar in (A): 100 $\mu$ m, which also applies to (B).  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

위해 이중 면역형광염색 분석을 실시하였다. 전부는 아니지만 상당 수준으로 두 단백질의 신호가 중첩하고 있었다(Fig. 13).



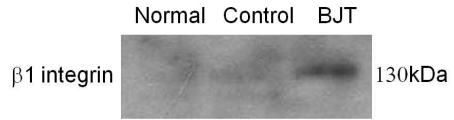
**Fig. 13.** Double Immunofluorescence staining of phospho-Erk1/2 (red) and phospho-vimentin (green).

The images shown here are prepared from the nerve of the animal treated with both STZ and BJT. Scale bar: 100 $\mu$ m.

4)  $\beta$  integrin 단백질 관련인자에 미치는 영향

(1) Western 분석에 의한  $\beta 1$  integrin에 미치는 영향

면역형광염색과 마찬가지로 normal군에서 단백질 밴드는 검출되지 않았으나 control군에서 희미한 밴드가 확인되었다. 이에 반해, BJT군에서는 control군에 비하여  $\beta 1$  integrin이 뚜렷한 밴드로 확인되었다(Fig. 14).

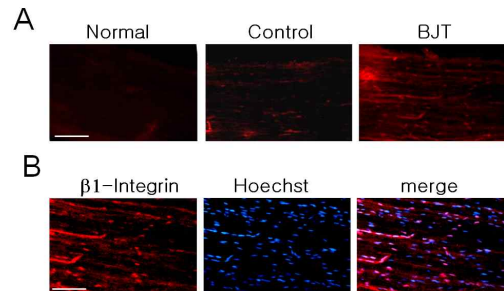


**Fig. 14.** Western blot analysis of  $\beta 1$  integrin in protein samples from the sciatic nerves after different treatments.

$\beta 1$  integrin was identified as double bands at 130 kDa.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(2) 면역형광염색분석에 의한  $\beta 1$  integrin 생성 및 분포에 미치는 영향

Normal군에서  $\beta 1$  integrin은 거의 탐지되지 않았으며 control군에서도 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 15A). BJT군의 경우 뚜렷한  $\beta 1$  integrin 단백질이 관찰되었다. BJT군에서 Hoechst 핵 염색 이미지를  $\beta 1$  integrin 면역형광염색 이미지와 중첩 관찰한 결과 강한  $\beta 1$  integrin 단백질 신호가 핵 염색 부위와 중첩되었다(Fig. 15B).



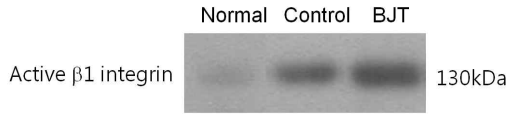
**Fig. 15.** Immunofluorescence staining analysis of  $\beta 1$  integrin signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for  $\beta 1$  integrin (in red). (A) Representative fluorescence staining images. (B) Merged images of  $\beta 1$  integrin with Hoechst-stained nuclei. Scale bar in (A, B): 100 $\mu$ m.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(3) Western 분석에 의한 active  $\beta 1$  integrin에 미치는 영향

Normal군에서 단지 약한 밴드가 확인되었으며,

control군에서 단백질 밴드강도는 뚜렷이 증가하였고, BJT군에서는 control군에 비하여 단백질 밴드가 증가되었다(Fig. 16).

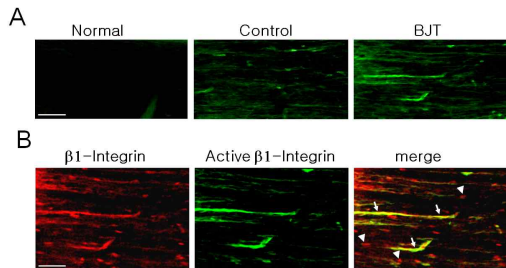


**Fig. 16.** Western blot analysis of active  $\beta 1$  integrin in protein samples from the sciatic nerves after different treatments.

Active  $\beta 1$  integrin was identified as double bands at 130 kDa.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(4) 면역형광염색 분석에 의한 active  $\beta 1$  integrin에 미치는 영향

Normal군에서 active  $\beta 1$  integrin은 전혀 탐지 않았으며 control군에서는 약한 정도의 단백질 신호가 관찰되었다. BJT군에서는 보다 증가된 수준의 단백질 신호가 관찰되었다(Fig. 17A). BJT군 조직에서 active  $\beta 1$  integrin과  $\beta 1$  integrin 단백질 신호의 위치 확인을 위하여 이중면역형광염색을 실시한 결과, active  $\beta 1$  integrin은  $\beta 1$  integrin 신호부위에 겹치는 양상을 나타내었다. 반면 일부  $\beta 1$  integrin의 단백질 신호는 active  $\beta 1$  integrin 단



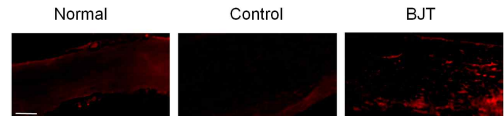
**Fig. 17.** Immunofluorescence staining analysis of active form of  $\beta 1$  integrin signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for active  $\beta 1$  integrin (in green). (A) Representative fluorescence staining images. (B) Double immunofluorescence staining of the nerves treated with STZ and BJT with total (red) and active  $\beta 1$  integrin proteins (green). Scale bar in (A, B): 100 $\mu$ m.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

백질 신호를 나타내지 않았다(Fig. 17B).

(5)  $\beta 3$  integrin에 미치는 영향

$\beta 3$  integrin 단백질 생성을 좌골신경 조직에서 조사한 결과, normal군이나 control군에서 뚜렷한 단백질 신호를 나타내지 않았으며, BJT군에서는 다소 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 18).

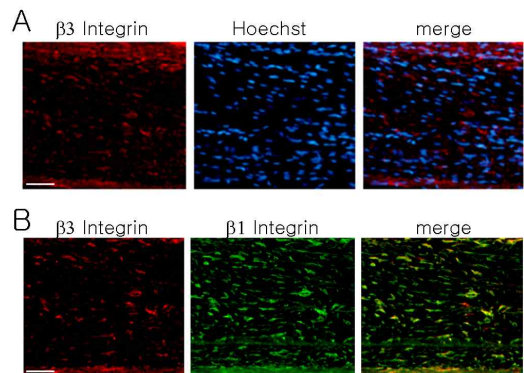


**Fig. 18.** Immunofluorescence staining analysis of  $\beta 3$  integrin signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for  $\beta 3$  integrin (in red). Scale bar: 200 $\mu$ m.  
 Normal : non-treated group.  
 Control : STZ(200mg/kg) + saline  
 BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

(6)  $\beta 3$  integrin의 비신경세포와의 연결성에 미치는 영향

$\beta 3$  integrin의 비신경세포와의 연결성 여부를 조사하기 위하여 BJT군에서 신경조직의 Hoechst 핵 염색 이미지와 이미지 중첩을 시도하였다.  $\beta 3$  integrin은 핵 염색부위와 거의 일치하지 않은 양



**Fig. 19.** Double stained images of  $\beta 3$  integrin in the nerves treated with STZ and BJT.

(A) Merged images of  $\beta 3$  integrin with Hoechst-stained nuclei. (B) Double immunofluorescence staining with  $\beta 3$  integrin proteins (red) and active  $\beta 1$  integrin (green). Scale bar in (A, B): 100 $\mu$ m.

상을 나타내었다. 또한  $\beta 3$  integrin은 상당수준  $\beta 1$  integrin 단백질 신호와 위치가 중첩되는 것으로 확인되었다(Fig. 19).

5) Phospho-Smad에 미치는 영향

Normal군에서 뚜렷한 단백질 신호는 확인되지 않았으며 control군에서 뚜렷한 단백질 신호가 검출되었고, BJT군에서는 control군에 비하여 감소되었다(Fig. 20).

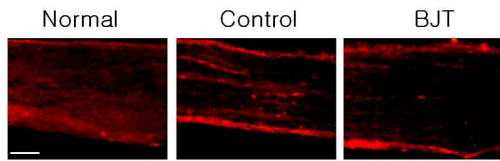


Fig. 20. Immunofluorescence staining analysis of phospho-Smad signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for phospho-Smad (in red).

Scale bar: 200 $\mu$ m.

Normal : non-treated group.

Control : STZ(200mg/kg) + saline

BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

6) Caspase 3에 미치는 영향

Caspase 3 단백질은 normal군에서는 전혀 검출되지 않았으며, control군에서는 신경조직에서 뚜

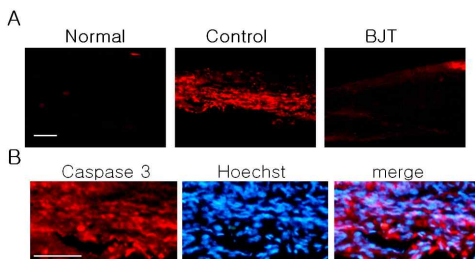


Fig. 21. Immunofluorescence staining analysis of caspase 3 signals in the longitudinal sciatic nerve sections.

Following treatments of STZ and BJT, sciatic nerve sections were used for immunofluorescence staining for caspase 3 (in red). (A) Representative fluorescence staining images. (B) Merged images of  $\beta 1$  integrin with Hoechst-stained nuclei. Scale bar in (A, B): 200 $\mu$ m.

Normal : non-treated group.

Control : STZ(200mg/kg) + saline

BJT : STZ(200mg/kg) + BJT(400mg/kg)

렷한 유도를 나타내었다. 이에 반해, BJT군에서는 caspase 3가 control군에 비하여 발현이 감소하였다(Fig. 21A). Control군에 대하여 Hoechst 핵 염색 이미지와 caspase 3 면역형광염색 이미지를 중첩하여 관찰한 결과 핵 주변부에서 caspase 3 단백질 신호가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 21B).

고찰

당뇨병성 신경병증은 고령화 사회가 되어감에 따라 유병율과 치료에 대한 수요가 점차 높아지고 있으며<sup>8)</sup>, 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병 모두에서 나타난다. 주된 증상으로는 사지의 통증, 감각 실조, 신경병증성 궤양과 절단이 있으며, 신경 기능의 이상으로 발생하는 신경전도속도, 온도감각, 건반사, 진동각 등의 감소가 있다<sup>3)</sup>. 당뇨병성 신경병증의 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 고혈당증으로 인한 대사 장애와 미세혈관의 이상이 복합적으로 작용하는 것으로 보인다<sup>20,21)</sup>.

Sorbitol의 축적<sup>4,5)</sup>, phosphoinositide 대사의 변화<sup>22)</sup>, myo-inositol의 결핍<sup>23)</sup>, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 활성도의 감소<sup>24)</sup>, 내피의 nitric oxide synthase (eNOS)의 감소<sup>25)</sup>, NAD-redox의 불균형<sup>26)</sup>, 지방산 대사와 신경 성장인자의 변화<sup>27-31)</sup>와 같은 대사성 변화가 산화 스트레스를 유발하고 미토콘드리아의 기능을 손상시켜서 neuron과 슈만세포의 세포자멸을 야기하며, 내피 모세혈관의 허혈성 미세혈관 손상은 신경섬유의 비가역적인 구조 손상을 일으킨다<sup>27-30)</sup>.

현재 당뇨병성 신경병증의 치료는 혈당 조절, 병인론에 기초한 치료, 통증 조절 세 가지로 분류할 수 있다. 병인론에 따른 당뇨병성 신경병증의 치료약에 관한 연구는 다양하게 진행되고 있으며 현재 우리나라에서 임상적으로 사용하고 있는 약제는 알파 지방산과 감마 리놀렌산 등이 있다. 통증치료는 철저한 혈당조절과 아울러 삼환계 항우울제나 항경련제를 초기 용량부터 서서히 증량하여 통증을 조절한다. 만약 극심한 통증으로 인하여 증상 호전이 어려울 경우 약물의 복합처방과 아편 유사제 계통의 약제를 사용하고 있으며, 모든 약제들에 불응할 경우는 침습적인 치료를 고

려하는 실정이다<sup>32</sup>).

한의학적으로 당뇨병성 신경병증과 정확하게 부합하는 것은 없으나 消渴의 전변증으로 癰疽, 水病, 失明 등이 있으며<sup>33</sup>, 中醫學에서는 血痺, 痺證, 脚氣, 痿證, 消渴, 痛症 등과 유사한 것으로 보며, 기본적으로 消渴病이 오래되어 濕熱, 氣滯, 瘀血을 형성하면서 증상이 나타난다고 보았다<sup>8</sup>).

현재 당뇨병성 신경병증은 근본적인 치료보다는 대부분 증상 완화 차원에서 이루어지고 있고 원인에 따라 다양한 치료가 시도되고 있으나 그 기능이 제한적이고 약제의 부작용으로 인해 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있다. 일부 한의학적 연구에서 당뇨병성 신경병증에 한약 치료가 유효한 효과가 있다는 보고가 있었으나 당뇨병성 신경병증에 있어서 복합 처방에 대한 실험적인 연구는 아직 많지 않은 실정이다.

본 연구에 사용한 BJT는 임상적으로 당뇨병과 항암제 부작용으로 인한 말초신경병증에 유의한 효과가 있다고 보고된 처방이다<sup>17,18</sup>).

이에 저자는 BJT가 당뇨병성 신경병증으로 인해 손상된 중추 및 말초신경 재생에 효과가 있을 것으로 판단하고 STZ로 당뇨가 유발된 백서 모델에 대한 조직학적, 생화학적 실험을 통해 말초신경 재생효과를 관찰해보았다.

첫째, 당뇨병성 말초신경병증에 대한 BJT의 효과를 검증하기 위해, 배양신경세포의 형태적 분석을 *in vitro* 실험을 통해 관찰 하였다. BJT0.3군에는  $198 \pm 11.7$  ( $p < 0.05$ ), BJT0.5군에서는  $238.2 \pm 12.2$  ( $p < 0.01$ )로 control군에 비하여 유의성 있게 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 1A). 또한, BJT의 농도가 0.3mg/ml에서 0.5mg/ml로 농도가 증가함에 따라 축삭의 성장이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1B). DRG sensory neuron의 배양시 함께 존재하는 비신경세포의 신경세포에 대한 분포를 조사하기 위하여 Hoechst 332598 및 NF-200으로 핵 염색을 시행하였다. 포도당을 투여한 control군은 비신경세포의 핵이 신경세포와 일부만이 인접하였다. 반면 BJT군에서는 축삭돌기의 성장이 개선되었다. 또한, BJT군에서는 비신경세포의 핵 대부분이 신경세포와 상당히 근접하여 있었다(Fig. 2). 이상, *in vitro* 실험상에서 배양신경 세포의 형태적 분석

을 실시한 결과를 종합하면 BJT를 투여한 결과 BJT는 각각의 축삭돌기 성장을 촉진하였을 뿐 아니라 세포체로부터 축삭돌기 가지수를 크게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, DRG sensory neuron의 배양시 대다수의 슈반세포로 구성된 비신경세포의 핵 대부분이 신경세포와 근접한 것을 확인할 수 있었다. 이는 BJT가 신경세포 뿐만이 아니라 혈관이나 조직과 같은 비신경세포의 성장도 증가시키며 이러한 과정에 슈반세포의 증식이 큰 역할을 하는 것으로 보아 BJT는 슈반세포의 증식과 재생에 유의한 효과가 있음을 알 수 있었다.

둘째, BJT 투여가 말초신경의 반응성에 미치는 영향을 알아보기 위해, *in vivo* 실험상에서 STZ 투여 후 유발된 당뇨병성 신경병증에 대해서 BJT를 투여한 후, NF-200, GAP-43, Cdc2, S100 $\beta$ , phospho-vimentin, phospho-Erk,  $\beta$ -integrin, phospho-Smad, caspase 3 등의 단백질표 물질을 사용하였다.

축삭의 재생반응성 지표물질인 NF-200, GAP-43과 Hoechst 33258 염색을 통해 슈반세포에 미치는 영향을 알아보았다. STZ 처리 후 좌골신경에 존재하는 축삭의 형태적 변화를 관찰하기 위해 NF-200으로 면역형광염색을 하였다. BJT군에서는 NF-200에 대한 염색수준이 control군에 비하여 크게 개선되어 normal군과 유사한 형태로 회복 되었다(Fig. 3).

축삭의 형태적 변화 및 재생 반응성을 관찰하기 위해 축삭재생 지표 단백질인 GAP-43을 통해 알아보았다. BJT군에서는 GAP-43은 control군에 비하여 뚜렷하게 나타났다(Fig. 4). 또한, GAP-43 단백질 신호를 관찰하기 위해 western blot 분석 하였다. BJT군에서는 GAP-43 단백질이 control군에 비하여 발현이 증가되었다(Fig. 5).

좌골신경에 존재하는 비신경세포의 수치와 형태적 변화를 분석하기 위하여 Hoechst 핵 염색을 통해 슈반세포에 미치는 영향을 알아보았다. Normal군, control군, BJT군간의 세포핵 형태는 차이가 나지 않았다. 단위면적당 세포수치는 BJT군에서는  $192.8 \pm 16.9$ 로 control군에 비하여 수치가 증가하였다(Fig. 6). 위의 결과를 종합한 결과,

NF-200을 통해 BJT 투여 후 STZ로 유발된 말초 신경병증에 BJT 투여 후 손상된 축삭이 정상 수준에 가까이 재생되는 것을 알 수 있었다. 이에 BJT가 STZ로 손상된 말초신경의 축삭 재생에 효과가 있는 것으로 추정된다. 또한, 신경 손상 과정에서 나타나는 GAP-43을 western blot 분석과 조직 상에서 관찰한 결과, STZ 처리 후 좌골신경의 손상이 유발되었음을 알 수 있었으며, STZ 투여 후 GAP-43이 증가한 것으로 보아, STZ 투여 후 말초신경손상이 일어났으며, 이후 자연적인 신경 재생이 일어났음을 확인 할 수 있었다. BJT 투여 후 GAP-43 단백질의 생성 수준이 control군에 비해 더욱 증가한 것으로 보아, BJT는 말초신경의 신경 재생을 더욱 촉진하는 것으로 사료된다. 또한, Hoechst 핵 염색을 통해 BJT 투여 후 비신경세포에서 슈반세포를 관찰한 결과를 고찰해 볼 때, STZ 처리 후 비신경세포에서 슈반세포의 숫자가 감소하였으며, BJT 처리 후 슈반세포의 수가 증가하였고, 이는 BJT가 신경세포뿐만 아니라 혈관이나 조직과 같은 비신경세포의 증식과 재생에도 긍정적인 영향을 미치는 것을 의미한다.

Cdc2 신호경로 관련인자를 중심으로 알아보았다. 좌골신경에서 western blot 분석을 실시한 결과, BJT군에서는 Cdc2의 발현이 control군 보다 더욱 증가하였다(Fig. 7). 추가적으로 Cdc2 단백질 생성을 신경조직에서 분석해 보았다. BJT군의 경우 control군에 비해 추가적으로 증가하였다. 좌골신경 조직을 횡단으로 절단 후 Cdc2 단백질과 S100 $\beta$ 에 대한 이중면역형광염색 분석을 실시한 결과 Cdc2 단백질 신호는 S100 $\beta$ 의 신호를 나타내는 세포에서 모두 탐지되었다(Fig. 8B).

Cdc2에 의해 인산화 되어 활성화도 변화를 나타내는 phospho-vimentin 단백을 western blot 분석과 면역형광염색을 통해 알아보았다. Western blot 분석에서 phospho-vimentin 단백질은 normal군에서는 생성되지 않았으나 control군에서는 뚜렷하게 확인되었다. 이에 더하여, BJT군의 경우 phospho-vimentin 단백질 수준이 더 증가하였다(Fig. 9). Phospho-vimentin의 조직상 분포를 조사하기 위하여 실시한 면역형광염색에서도 western blot 분석과 결과는 상동하였다(Fig. 10A). BJT군

에서 phospho-vimentin 단백질을 Hoechst 핵 염색 이미지와 중첩하여 관찰한 결과 긴 섬유상 형태로 핵 염색 부위에 중첩되는 분포를 나타내었다(Fig. 10B).

Cdc2는 normal군에서는 관찰되지 않았으며, STZ 처리 후 손상된 좌골신경에서 Cdc2가 발현된 것으로 보아 슈반세포의 증식과 이주가 자연적으로 나타난 것을 알 수 있었다. BJT 투여 후 Cdc2의 생성수준이 증가한 것으로 보아, BJT가 손상된 좌골신경에서 슈반세포의 활성을 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, Cdc2 단백질 신호가 슈반세포 특이 단백질인 S100 $\beta$ 의 신호를 나타내는 세포에서 모두 탐지된 것으로 보아 Cdc2 단백질은 좌골신경 슈반세포의 증식과 재생에 강하게 연관되어 있음을 확인 할 수 있었다. Cdc2 kinase substrate 중에 하나인 vimentin 단백질을 통해 관찰한 결과도, Cdc2 자체만을 관찰한 결과와 다르지 않았으며, BJT군에서 phospho-vimentin 단백질이 핵 염색 부위에 중첩해서 나타난 것을 관찰한 결과, BJT가 핵 부위에서 세포의 증식과 재생에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

이를 종합하면, STZ 처리 후 슈반세포의 신경 재생 작용이 일어나면서 Cdc2가 핵 부위에서 발현 되는 것을 관찰 할 수 있었고, BJT 투여 시 이러한 Cdc2의 발현이 더욱 촉진되는 것으로 보아, BJT는 슈반세포의 신경 재생 능력을 증가시키는 것으로 사료 된다.

신경조직 세포의 활성화 변화를 분석하기 위해 좌골신경에서 phospho-Erk1/2 단백질을 중심으로 알아보았다. Western blot 분석과 면역형광염색을 통해 관찰한 결과, normal군에서 phospho-Erk1/2는 전혀 보이지 않았으며, control군에서도 보이지 않았다. 이에 반해, BJT군에서는 강하게 생성되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 11), (Fig. 12A). BJT군의 좌골신경 조직에 대해 phospho-Erk1/2 단백질과 Hoechst 핵 염색 이미지를 중첩한 결과 phospho-Erk1/2는 띠 형태 모양으로 핵 염색 부위에 강하게 중첩되어 나타났다. 반면에 일부 phospho-Erk1/2 신호는 비핵염색부위에서도 관찰되었다(Fig. 12B). Phospho-Erk1/2의 뚜렷한 단백질 신호를 나타내는 BJT군에서 신경조직에 대해

phospho-vimentin 단백질 신호와 중첩성 여부를 관찰하기 위하여 이중 면역형광염색 분석을 실시하였다. 관찰 결과 상당한 수준으로 두 단백질 신호가 중첩하고 있었다(Fig. 13).

위의 실험 결과를 분석한 결과, BJT 투여 시 STZ로 손상된 좌골신경세포에서 phospho-Erk1/2의 신호가 증가하였으며, 이는 phospho-vimentin 단백질 신호와 상당부분 중첩하였다. phospho-Erk1/2는 세포 외부 자극을 전달하여 세포내 반응을 일으키는데 중요한 역할을 하는 단백질이며, phospho-vimentin은 Cdc2에 의해 활성화되어 슈반세포의 작용을 증가시키는 단백질이다. 이에 BJT 투여 시 슈반세포의 작용이 증가되어 말초신경세포가 재생됨을 알 수 있다. 또한 BJT 투여 후 phospho-Erk1/2 단백질이 핵과 핵 주변부에서 모두 발현된 것으로 보아 BJT는 세포의 핵과 세포의 주변부에서 모두 세포의 재생에 관여하는 것으로 사료된다.

좌골신경에서  $\beta$  integrin 단백질 생성 및 분포를 조사하였다.  $\beta 1$  integrin의 정량적 비교분석을 위하여 western blot 분석을 실시한 결과, normal군에서 단백질 밴드는 검출되지 않았으나 control군에서 희미한 밴드가 나타났다. 이에 반해, BJT군에서  $\beta 1$  integrin은 뚜렷한 밴드로 나타났다(Fig. 14). 면역형광염색을 통해 관찰한 결과도 western blot 분석을 통해 실시한 결과와 크게 다르지 않았다(Fig. 15A).  $\beta 1$  integrin의 생성을 나타낸 BJT군에서 Hoechst 핵 염색을 통해 관찰한 결과 강한  $\beta 1$  integrin 단백질 신호가 핵 염색 부위와 중첩되었다(Fig. 15B).

Active  $\beta 1$  integrin의 생성 수준 변화를 알아보기 위해 western blot 분석을 실시한 결과, normal군에서는 약한 밴드가 확인되었고 control군에서 단백질 밴드가 관찰되었으며, BJT군에서 더욱 증가된 단백질 밴드가 관찰되었다(Fig. 16). 좌골신경 조직상에 active  $\beta 1$  integrin의 분포를 면역형광염색을 통하여 조사한 결과도, western blot 분석과 다르지 않았다(Fig. 17A). BJT군에서 active  $\beta 1$  integrin과  $\beta 1$  integrin 단백질 신호의 위치 확인을 위하여 이중면역형광염색을 실시한 결과 active  $\beta 1$  integrin은  $\beta 1$  integrin 신호부위와 겹치

는 형태를 나타내었다(Fig. 17B). 반면 일부  $\beta 1$  integrin의 단백질 신호는 active  $\beta 1$  integrin 단백질을 나타내지 않았다.

위의 실험 결과를 종합해보면, STZ에 의해 손상된 좌골신경조직에서  $\beta 1$  integrin과 active  $\beta 1$  integrin의 생성이 증가하였으며, BJT군에서 더욱 증가하는 것을 알 수 있었다. STZ 투여 시 손상된 상태는 생리적인 보상작용으로 관찰되며, BJT 투여 시 발현이 증가되며  $\beta 1$  integrin과 active  $\beta 1$  integrin의 분포가 유사하게 나타난 결과는 BJT가 새로운 active  $\beta 1$  integrin 단백질을 생성하는 것이 아니라 손상 이후 발현된  $\beta 1$  integrin을 active  $\beta 1$  integrin으로 활성화시켜 신경세포의 재생을 촉진하는 것으로 해석된다.

BJT군에서 Hoechst 핵 염색을 통해 관찰해 본 결과,  $\beta 1$  integrin 단백질 신호가 핵 염색 부위와 중첩된 것으로 보아 세포 사이의 결합 및 세포외기질의 결합이 핵 부위에서 일어난 것으로 사료된다. Active  $\beta 1$  integrin의 결과도  $\beta 1$  integrin과 유사하게 분포 하였으나, 일부는 일치하지 않은 것으로 보아 active  $\beta 1$  integrin은 핵 이외의 부위에서도 발현이 되는 것으로 사료된다.

좌골신경 조직에서  $\beta 3$  integrin 단백질 생성을 알아보았다. Normal군이나 control군에서는 단백질 신호를 나타내지 않았다. 이에 반해, BJT군에서는 다소 증가하였다(Fig. 18). 또한  $\beta 3$  integrin과 비신경세포와의 연결성 여부를 조사하기 위하여 BJT군의 신경조직에서 Hoechst 핵 염색을 하였다.  $\beta 3$  integrin은 핵 염색부위와 거의 일치하지 않았다(Fig. 19A). 또한  $\beta 3$  integrin은 상당수준  $\beta 1$  integrin 신호와 위치가 중첩되었는데(Fig. 19B), Fig. 11, 12의 결과와 같이 생각해보면 BJT가 Erk1/2를 발현시키고  $\beta 3$  integrin을 함께 발현시키는 것으로 보인다. BJT군에서  $\beta 1$  integrin의 생성이 증가하였고, active  $\beta 1$  integrin 단백질 신호가 관찰된 사실을 통해 BJT 투여가 세포 부착에 관여하는  $\beta 1$  integrin을 활성화시켜 세포 재생을 촉진시킨다는 것을 알 수 있다. BJT 투여 후  $\beta 1$  integrin과  $\beta 3$  integrin이 상당 수준 중첩된 것으로 보아, BJT 투여 후  $\beta 3$  integrin과  $\beta 1$  integrin이 같이 활성화 된 것으로 사료되며, 세포 재생의 지

표단백질로서의  $\beta 3$  integrin의 역할을 고려한 결과, BJT가 말초 신경조직의 신경세포뿐만이 아니라 신생 혈관과 같은 비신경 세포조직의 재생에도 유의한 효과가 있을 것으로 사료된다.

Phospho-Smad 단백질의 좌골신경 조직상 분포를 조사하였다. Phospho-Smad 단백질의 좌골신경 조직상 분포를 조사한 결과, normal군에서 단백질 신호가 관찰되지 않았으며, control군에서는 뚜렷한 단백질 신호가 검출되었다. 반면 BJT군에서는 감소되었다(Fig. 20). 본 실험에서는 BJT 투여 후 phospho-Smad 단백질의 분포가 감소한 바, 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

Caspase 3의 좌골신경 조직에서 생성수준을 조사하였다. Caspase 3는 normal군에서는 검출되지 않았으며, control군에서는 뚜렷하게 나타났다. 이에 반해, BJT군에서는 caspase 3 단백질의 발현이 control군에 비해 감소하였다(Fig. 21A). Control군에 대하여 Hoechst 핵 염색 이미지와 caspase 3 형광염색 이미지를 중첩하여 관찰한 결과, 핵 주변부에서 caspase 3 단백질 신호가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 21B). 이는 STZ 처리로 인하여 신경세포가 손상되어 apoptosis 과정이 진행되었음을 의미하며, BJT가 cell의 apoptosis 과정을 억제하는 효과가 있었음을 의미한다. 또한, STZ 처리 후 세포 자멸이 핵 주변부에서 나타나고 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험으로 BJT는 STZ 처리 후 유발된 당뇨병성 말초신경병증에서 슈만세포의 신경재생 매개 작용 활성화에 영향을 주어 신경재생을 촉진시킨다는 점을 알 수 있었다. 향후 기계적 및 열적 통각역치 검사, 신경전도 속도 등에 대한 연구와 혈당 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

### 결론

STZ 처리 후 유발된 당뇨병성 신경병증 동물모델에서 BJT가 좌골신경과 DRG sensory neuron의 축삭돌기 재생에 미치는 영향에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BJT는 glucose 처리 후 손상된 DRG sensory neuron의 신경세포에서 축삭돌기의 성장을 증가시켰다.
2. BJT는 STZ 처리 후 손상된 좌골신경에서 NF-200, GAP-43, Cdc2, phospho-Erk1/2 단백질 생성을 촉진하였다.
3. BJT는 STZ 처리 후 손상된 좌골신경에서  $\beta 1$ , active  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  integrin 단백질 생성을 촉진하였다.
4. BJT는 STZ 처리 후 손상된 좌골신경에서 phospho-Smad 단백질 생성을 억제하였다.
5. BJT는 STZ 처리 후 손상된 좌골신경에서 caspase 3 단백질 생성을 억제하였다.

이상의 결과로 보기체통탕은 STZ 처리 후 유발된 당뇨병성 말초신경병증에서 슈만세포의 신경재생 매개 작용 활성화에 영향을 주어 신경재생을 촉진시키므로 향후 당뇨병성 말초신경병증의 치료에 이용될 수 있는 실험적 근거를 확인할 수 있었다.

### 참고문헌

1. The Whole Country College Korean Medicine, Department of Singye Internal Medicine. Singye Internal Medicine. Seoul:Koonja publishing co.. 2011:310.
2. Shaw JE, Zimmet PZ. The epidemiology of diabetic neuropathy. Diabetes. 1999;7:245-52.
3. Kathleen M, Halat, Cathi E, Dennehy, Pharm D. Botanicals and Dietary Supplements in Diabetic Peripheral Neuropathy. J Am Board Fam Pract. 2003;16(1):47-57.
4. Kinoshita JH, Nishimura C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. Diabetes Metab. 1988;4:323-37.
5. Kaul CL, Ramarao P. The role of aldose reductase inhibitions in diabetic complications: recent trends. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2001;23:465-75.
6. Green DA, Lattimer SA, Sima AF. Sorbitol, phosphoi-

- nositides and sodium-potassium ATPase in the pathogenesis of diabetic complication. *The New England Journal of medicine*. 1987;316(10):599-606.
7. Dyck PJ. Detection, characterization and staging of polyneuropathy: assessed in diabetes. *Muscle & Nerve*. 1988;11(1):21-32.
  8. Kim JM, Cho CS, Kim CJ. Overview of Diabetic Peripheral Neuropathy and Need for Therapeutic Strategy using Traditional Korean Medicine. *J Korean Oriental Med*. 2009;30(5):127-36.
  9. Chen YS, Wu CH, YAO CH, Chen CT. Ginsenoside Rb-1 enhance peripheral nerve regeneration across wide gaps in silicone rubber chambers. *Int J Artif Organ*. 2002;Nov;25(11):1103-8.
  10. Korean Diabetes Association, Group for Research on Neuropathy. *Diabetic Neuropathy*. Seoul:Gold Gihoek. 2006:172-3.
  11. Kang SB. 2 case of Diabetic Neuropathy Treatments. *J Korean Oriental Med*. 1992;13(2): 22-5.
  12. Park SW, Kang JK, Moon SK, Ko CN. Two experiences of the treatment for diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Korean Oriental Chronic Disease*. 1997;3(1):251-8.
  13. Cho KH, Jung S, Lee KJ. A Case of Yukmijihwanghwan's effect on Diabetic neuropathy. *Korean J. Orient. Int. Med*. 1999; 20(1):286-90.
  14. Kwon YK, Choi KR, Lee JS, Lee BC, Ahn YM, Ahn SY, et al. Two Cases of Diabetic Peripheral Polyneuropathy Improved by Bogan-tang. *J Korean Oriental Med*. 2002;23(1):170-7.
  15. Park SK, Kwon EH, Shin HC, Kang SB. One case of Diabetic Peripheral Polyneuropathy Improved by Binsosan-gambang. *J Korean Oriental Med*. 2005;26(4):935-40.
  16. Choi HS, Cho CS, Kim CJ. Clinical Study on Two Cases of In patients with Diabetic Peripheral Neuropathy. Daejeon University Institute of Korean medicine thesis Collection. 2004;13(2):251-8.
  17. Kim JM, Cho CS, Kim CJ.. Clinical Study of 8 Diabetic Patients with Paresthesia. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2010;31(2):184-91.
  18. An SH. Effects of Bogijetong-tang treatment on animal model of peripheral neuropathy induced by Taxol and crush injury. Doctoral Dissertation. Daejeon:Daejeon Univ.;2012.
  19. Banker G, Goslin K. Culturing nerve cells. MIT press. 2002.
  20. Felderman EL, Russell JW, Sullivan KA, Golovoy D. New insights into the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 1999; 12:553-63.
  21. Verrotti A, Giuva PT, Morgese G, Chiarelli F. New trends in the etiopathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *J Child Neurol*. 2001;16: 389-94.
  22. Stevens MJ, Felderman EL, Greene DA. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabet Med*. 1995;12:566-79.
  23. Greene DA, Lewis RA, Lattimer SA, Brown MJ. Selective effects of myo-inositol administration on sciatic and tibial motor nerve conduction parameters in the streptozocin-diabetic rat. *Diabetes*. 1982;31:573-8.
  24. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Felderman EL, Lattimer SA. Complication: neuropathy, pathogenetic consideration. *Diabetes Care*. 1992;15:1902-25.
  25. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Inhibition of heparin-catalyzed human antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation. Possible role in fibrin deposition in diabetes. *Diabetes*. 1984;33:532-5.
  26. Tilton RG, Chang K, Nyengaard JR, Van den Enden M, Ido Y, Williamson JR. Inhibition of



- sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes*. 1995;44:234-42.
27. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 1995;18:1160-7.
  28. Karasu C, Dewhurst M, Stevens EJ, Tomlinson DR. Effects of antioxidant treatment on sciatic nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats; comparison with essential fatty acids. *Diabetologia*. 1995;38:129-134.
  29. Hotta N, Koh N, Sakakibara F, Nakamura J, Hamada Y, Wakao T, et al. Prevention of abnormalities in motor nerve conduction and nerve bloodflow by a prostacyclin analog, beraprost sodium, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Prostaglandins*. 1995;49:339-49.
  30. Cameron NE, Cotter MA. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997;2:S31-7.
  31. Hounsom L, Horrobin DF, Tritschler H, Corder R, Tomlinson DR. A lipoic acid-gamma linolenic acid conjugate is effective against multiple indices of experimental diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 1998;41:839-43.
  32. A society for the research of Neuropathy in Korean Diabetes Association. *Clinical practice of diabetic neuropathy*. 2nd ed. Seoul: Korean Diabetes Association. 2007:1-48.
  33. Doo HK. *Internal medicine of kidney in oriental medicine*. Seoul :Institute of oriental medicine. 1991:969-76.