

Streptozotocin 저용량 반복투여로 유도한 당뇨 흰쥐에서 구기자 추출물의 효능연구

오태우^{1#}, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한방신약개발센터, 2 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Effect of the Lycii Fructus on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic rats

Tae Woo Oh^{1#}, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : Korean Medicine R&D center, Dongguk University

2 : Department of Herbolology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 38066, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the anti-diabetic effect of the fruit extract of *Lycium chinense* Mill(Lycii Fructus, LF) on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods : Male Sprague-Dawley rats were divided into three groups; normal, STZ-control, Lycii Fructus extract-orally administrated 300 mg/kg group (STZ-LF). Diabetes was induced in rats by consecutive injection of streptozotocin (STZ) at doses of 30 mg/kg for 5 days. After 4 weeks, all rats were sacrificed, Fasting blood glucose, total cholesterol (CHO), triglyceride (TG) and HDL-Cholesterol were measured in sera of rats. Histopathological changes of pancreas, kidney, liver and lung tissues were observed by microscope after H&E, Periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's trichrome staining. The changes of body weight, blood glucose, and food and water intake were also measured.

Results : There were no differences in body, food intake and water intake in LF-administrated groups compared with STZ control group. However, LF extract significantly decreased the levels of serum glucose, CHO, TG and HDL-Cholesterol in diabetic rats. In histopathological analysis of kidney, liver and lung, LF-administrated groups showed the inhibition of morphological damage.

Conclusions : These results suggest that LF have a biological action on multi low-dose STZ-induced diabetes in rats via decreasing the serum glucose, TG and TG levels and may protect the morphological changes of kidney, liver and lung.

Key words : Diabetes, Streptozotocin, multiple administration, Lycii Fructus, histopathological analysis

서론

최근 우리사회는 식습관이 서구화로 변하면서 고지방, 고탄수화물의 섭취량이 늘어나고 이로 인하여 비만인구가 증가하고 있는 추세이다. 이러한 비만인구 증가는 고지혈증, 고혈압, 인슐린 저항성 등을 동시에 가지고 있는 대사증후군을 야기 할 수 있으며, 당뇨병(diabetes)은 혈당조절에 필요한 인

슐린의 절대적 또는 상대적 결핍에 의해 발생된 고혈당을 특징으로 크게 인슐린 의존성과 인슐린 비의존성 당뇨병¹⁻²⁾으로 분류 되는 대표적인 대사성 질환이다³⁾.

한방에서는 비만의 원인을 脾爲濕困, 肝脾不調, 胃腸機能失調 등으로 보았으며, 비만이 오래 지속되면 신에도 영향을 주어 비신이 모두 허하게 된다고 하였다⁴⁾. 결과적으로 비만은 생체 에너지대사에 관여하는 여러 기관들의 생체기능에 부의

*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbolology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-814, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2647 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#First author : Tae Woo Oh, Korean Medicine R&D center, Dongguk University

· Tel : +82-54-770-2658 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : flsdn1@naver.com

· Received : 16 October 2015 · Revised : 25 November 2015 · Accepted : 25 November 2015

효과를 나타내어 대사성 질환의 원인이 될 수 있음을 시사하고 있다. 인슐린 저항성은 인슐린 비의존형인 제2형 비만형 당뇨병의 중요한 병인으로 체중 증가와 당뇨병이 밀접하게 관련 있고, 실제 비만 동물실험들에서 체중감소가 인슐린 저항성과 혈당조절 효과에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있어 체중감소가 인슐린 저항성 개선 및 당뇨병 치료에 중요함을 인식하고 있다⁵⁻⁶⁾.

구기자는 가지과(Solanaceae) 구기자나무(*Lycium chinense* Miller) 또는 영하구기(寧夏枸杞, *Lycium barbarum* Linnè)의 열매를 구기자(Lycii Fructus)라하며 근피를 지골피(Lycii Radicis Cortex), 잎을 구기엽이라 하여 부위에 따라 그 약효가 다르다⁷⁾. 구기자는 성질(性)은 평(平)하며 맛(味)은 달고(甘)하며 귀경은 간(肝), 신(腎), 폐(肺)로 자보약(滋補藥)으로 쓰여 자양강장(養強壯), 간신음허(肝腎陰虛), 간신(肝腎)의 기능부족으로 음혈(陰血)이 허약해 졌을 때, 음기(陰氣)를 보(補)하고 갈증을 그치게 하며 소갈(消渴)에도 유효하며, 폐기능 허약으로 인한 오랜 해수 및 목현(目), 유정(遺精)을 치료하는데 쓰였다⁸⁾. 구기자의 항당뇨에 대한 현대약리 연구로는 alloxan 및 STZ의 독성물질로 유도한 당뇨 흰쥐에서의 체중 증가, 혈당 강하, 혈중 지질대사에 대한 효능⁹⁾ 및 당뇨병성 백내장과 망막변증에 대한 개선 효과¹⁰⁾ 및 죽상경화증 함량 감소¹¹⁾, 고지혈증 병태모델 혈청지질의 상승억제효과¹²⁾와 혈당 강하작용¹³⁾ 등이 보고 되었다.

구기자는 betaine, cholin, dipalmityl-zeaxanthin(physaline), rutin, β -sitosterol carotenoid, meliscic acid, zeaxanthin, physalien, 과 불포화지방산이 다량 함유 되어¹⁴⁾ 항산화¹⁵⁾, 항균, 항암, 면역증진효과¹⁶⁾ 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 구기자의 소갈에 대한 효능을 현대 약리적 방법으로 해석해보고자 Streptozotocin (STZ)를 저용량 반복 투여하여 당뇨병 흰쥐모델을 제작하였으며, 4주 동안 구기자 투여를 통하여 당뇨병 관련 표적 장부에서의 조직학적 변화와 혈액학적 변화를 관찰함으로써 구기자의 인체 내 역할을 해석해보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료의 조제

본 실험에 사용된 구기자(Lycii Fructus)는 규격화 약재를 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입한 후 대한약전에 따라 검정한 후, 구기자 200 g에 정제수 2L를 가하여 열탕추출기에서 3시간씩 2회 가열한 후 얻은 물추출물을 와트만 여과지(Whatman NO. 1)로 여과하여 회전식 감압농축기로 감압 농축하였다. 농축된 추출물을 동결 건조함으로써 구기자 물추출물을 제조하였으며(수득율: 49.4%), 건조분말 상태로 냉장 보관하면서 실험 직전 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 7주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(SD rat, 200-220 g)를 (주)오리엔트바이오(경기도, 한국)로부터

분양받아 1주간의 적응기간 동안 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간동안 일반 고형사료(삼양사료주식회사, 서울, 한국)와 정수된 물을 자유 섭취시켰으며, 명암은 12시간(Day light 07:00 ~ 19:00)을 주기로, 실내온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 로 유지하여 실험종료 시까지 일정한 사육조건을 유지시켰다.

2. 방법

1) 당뇨 유발

적응기간이 완료된 흰쥐를 당뇨 유발을 위해 STZ(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 0.01M citrate buffer(pH 4.5)로 적정한 다음 30 mg/kg body weight(bw) 용량으로 1일 1회 5일 동안 복강 주사하였다. 이때 정상군은 동일한 양의 0.1M citrate buffer를 복강 주사하였으며, 마지막 STZ 투여 3일 후 혈당측정검사지 (Accu-Check, Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 이용하여 꼬리정맥으로부터 채혈한 혈액으로 혈당을 측정함으로써 당뇨 유발을 확인하였고, 혈당수치가 250 mg/dl가 넘는 동물만 선발하여 약물군으로 나누어 본 실험에 사용하였다.

2) 실험군 설정

실험군은 정상군(Normal, n=5)과 STZ 투여에 의해 당뇨병이 유발된 당뇨 유발 대조군(STZ-control, n=12), 당뇨 유발 실험군(STZ-LF, n=11)으로 나누어 매일 1회 일정한 시간에 정상군과 당뇨 유발 대조군에는 실험군과 동일 양의 생리식염수를 경구 투여하였으며, 실험군에는 구기자추출물을 300 mg/kg 용량으로 4주 간 경구 투여하였다.

3) 체중, 음수량 및 섭취량 측정

STZ 투여를 시작한 날을 -5일째로 하여 4주 동안 체중, 음수량과 섭취량을 2일 1회 측정하였다.

4) 혈당 측정 및 혈액 수집

혈당의 측정은 매주 1회 최소 10시간 이상 절식시킨 후 모든 동물의 꼬리정맥으로부터 혈액을 수집하여 혈당측정검사지 (Accu-Check)를 이용해 측정하였다. 또한 29일째 1.5% isoflurane으로 흡입 마취시킨 모든 동물을 희생시키고 심장을 통해 혈액을 수집하여 5,000rpm에 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, -80°C 에 보관하면서 혈액마커 분석을 위한 시료로 사용하였다.

5) 혈액마커 측정

혈청 내 총콜레스테롤(total cholesterol, CHO)과 중성지방(triglyceride, TG), 글루코스(glucose)의 농도는 효소시약 키트(에이치바이오(주), 안양, 한국)를 사용하여 측정하였으며, 혈청 내 각 혈액 마커의 농도는 kit 내 표준용액의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

6) 병리조직학적 관찰

각 조직의 병리학적 변화를 관찰하기 위하여 췌장, 폐, 간

조직을 4%의 paraformaldehyde에 24시간 담가 고정하고, 파라핀 포매 과정 후 microtome을 이용하여 2 μ m 두께로 박절하여 조직슬라이드를 제작하였다. 각 조직의 H&E 염색을 위해 조직슬라이드를 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 2~3분간 염색한 후 탈수과정을 거쳐 mounting 과정을 시행한 후 광학현미경을 이용하여 조직학적 변화를 관찰하였다.

한편, 조직 내 섬유화 정도를 확인하기 위해 신장조직슬라이드를 Bouin 용액(SigmaCo., St Louis, USA)에 하루 동안 담가 놓은 후 조직표본의 노란색이 없어질 때까지 수세하였다. 이를 hematoxylin으로 10분간 염색한 후 Biebrich Scarlet-acid fuchsin 용액으로 10분간 염색하였으며 다시 phosphomolybdic / phosphotungstic acid 용액에 10분간 반응시켰다. 끝으로 aniline blue 용액으로 5분간 염색한 후 수세하여 1% acetic acid 용액으로 1-3분간 적용시키고 염색 정도를 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

결 과

1. 체중 변화에 대한 효과

당뇨 흰쥐에서의 체중 변화를 측정한 결과, 정상군(Normal)의 체중은 4주까지 정상적으로 증가하였으나 STZ에 의해 당뇨가 유발된 대조군(STZ-Con)에서는 정상군에 비해 시간에 의존적인 체중 감소를 보였다(Fig. 1). 또한, 구기자 물추출물을 투여한 실험군(STZ-LF)에서도 대조군과 마찬가지로 체중이 유의하게 감소하는 경향을 관찰 할 수 있었지만, 대조군에 비하여서는 체중 감소가 덜 감소하는 것으로 나타났다.

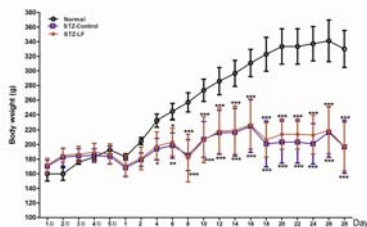


Fig. 1. The change of body weight in STZ-induced diabetic rats. STZ, was administrated with 30 mg/kg in rats. The body weight was measured once every 2 day. *** $p < 0.001$ vs. Normal (a) or STZ-Con (b). STZ-LF, Lycii Fructus 300 mg/kg/bw-administrated group.

2. 섭취량 및 음수량의 변화

저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서의 섭취량(food intake) 변화를 측정한 결과, 모든 그룹에서 식이 섭취량이 증가를 하였지만, 대조군(STZ-Con)과 실험군(STZ-LF)

에서 당뇨유발 2주째부터 현저한 섭취량의 증가를 보였으며(Fig. 2A), 또한 음수량(water intake) 변화의 경우, 정상군의 경우 4주까지 일정한 양의 음수량 변화를 나타내었으나 대조군(STZ-Con)과 실험군(STZ-LF)에서는 섭취량과 마찬가지로 2주째부터 음수량의 현저히 증가가 관찰되었다(Fig. 2B). 하지만, 실험군의 경우 4주째 대조군에 비하여 음수량의 감소가 관찰되었다.

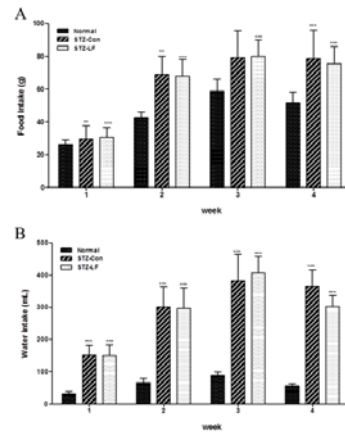


Fig. 2. The effect of LF extract on food and water intake in STZ-induced diabetic rats. Food(A) and water(B) intake was measured once every week, and values are represented as mean \pm SD (n=10). *** $p < 0.001$ vs. Normal (a) or STZ-Con (b). STZ-LF, Lycii Fructus 300 mg/kg/bw-administrated group.

3. 혈당 변화에 대한 효과

저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서의 혈당 변화를 측정한 결과, 정상군(Normal)의 혈당은 4주까지 정상범위의 혈당 수치를 나타내었으나 당뇨가 유발된 대조군에서는 당뇨 유발부터 현저한 혈당 증가와 함께 4주까지 지속적으로 혈당이 증가함으로써 고혈당 상태를 유지하였다(Fig. 3). 한편, 구기자 물추출물을 투여한 실험군(STZ-LF)에서는 당뇨를 유발한지 2주까지는 혈당의 감소가 보이지는 않았지만, 3주부터 대조군(STZ-Con)과 비교하였을 때, 혈당강하의 효과를 보이는 것으로 나타났다.

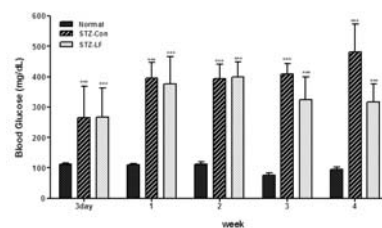


Fig. 3. The effect of LF extract on blood glucose in STZ-induced diabetic mice. Glucose level was measured in blood by Accu-check once every week, and values are represented as mean \pm SD (n=10). *** $p < 0.001$ vs. Normal (a) or STZ-Con (b). STZ-LF, Lycii Fructus 300 mg/kg/bw-administrated group.

4. 혈액마커의 변화

저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서의 혈액 마커의 변화에 대한 구기자의 효과를 확인하기 위해 총콜레스테롤

(total cholesterol), 중성지방(TG) 및 HDL-콜레스테롤(HDL-CHO), 혈중 글루코스(Glucose)의 변화를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 정상군에 비해 STZ에 의해 당뇨가 유발된 대조군에서 총콜레스테롤의 증가는 정상군(Normal)과 대조군(STZ-Con)에서는 큰 변화는 보이지는 않았지만, 실험군(STZ-LF)에서는 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며(Fig. 4A), HDL-콜레스테롤은 대조군(STZ-Con)에서는 정상군에 비하여 농도가 유의적으로 감소하였으며, 실험군(STZ-LF)에서는 유의적으로 증가한 것으로 하였다(Fig. 4B). 또한 중성지방의 경우 HDL-콜레스테롤과는 반대로 대조군(STZ-Con)에서 정상군(Normal)에 비하여 유의적으로 증가를 하였으며, 실험군(STZ-LF)에서는 대조군에 비하여 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(Fig. 4C). 한편 혈중 글루코스의 농도의 경우 정상군이 132 ± 19 mg/dL에 비해 대조군(STZ-Con)은 404 ± 42 mg/dL로 유의적으로 증가($p < 0.05$)하는 것으로 나타났으나, 구기자 물추출물을 투여한 실험군에서는(STZ-LF) 286 ± 38 mg/dL로 유의적인 감소($p < 0.05$)를 나타내었다(Fig. 4D).

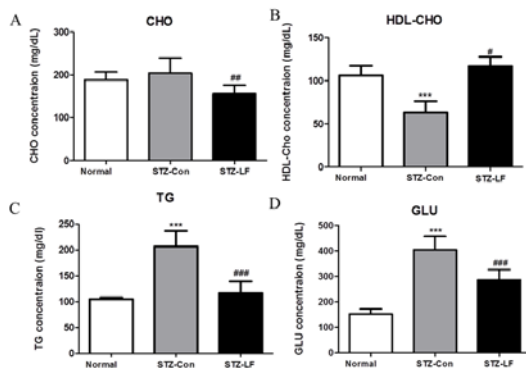


Fig. 4. The effect of LF extract on the changes of serological markers in STZ-induced diabetic mice. Each marker was measured in the serum, and values are represented as mean \pm SD (n=10). *** $p < 0.001$ vs. Normal (a) or STZ-Con (b). STZ-LF, Lycii Fructus 300 mg/kg/bw-administrated group.

5. 병리조직학적 변화

1) H&E 염색에 따른 조직학적 변화

저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서의 각 표적 장기별 병리조직학적 변화를 H&E 염색으로 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과, 정상군(Normal)의 췌장조직은 랑게르한스섬(islet of Langerhans)의 형태가 뚜렷하게 잘 보존되어 있었으며 많은 수의 선세포(acini cell)도 풍부한 것을 확인하였다. 그러나 당뇨 유발 4주 후 대조군(STZ-Con)의 췌장조직은 선세포 파괴와 함께 랑게르한스섬이 거의 관찰되지 않았으며, 그 형태도 불명확하게 관찰되었다. 하지만, 구기자 물추출물을 투여한 실험군(STZ-LF)에서는 대조군에 비하여 랑게르한스섬의 파괴와 선세포의 수적감소가 현저히 줄어든 것을 확인하였다(Fig 5A). 또한, 폐 조직에서는 정상군의 경우 기관지, 세기관지 등의 조직 형태가 잘 보존되어 있었으나 대조군(STZ-Con)에서는 기관지 내 염증세포 침윤과 더불어 기관지 비후에 따른 협착과 형태적 손상이 관찰되었다. 하지만 실험군에서는 조직의 염증성 침윤이나 형태학적 손상이 줄어든 것을 관찰하였다 (Fig 5B). 또한 간 조직 관찰에서도 정상군

(Normal) 및 실험군(STZ-LF)의 경우 다각형(polygonal)의 간세포 및 간세포에서 세포질이나 세포핵 등 병리학적 소견을 나타나지 않았으며, 대조군(STZ-Con)에서는 간세포의 배열이 불규칙적으로 관찰이 되었으며 구조적 손상이 많아진 것을 관찰하였다(Fig 5C).

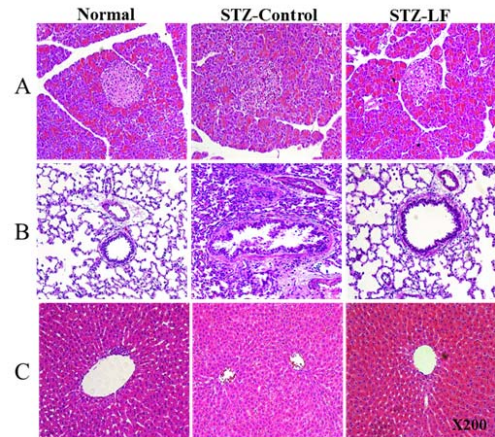


Fig. 5. The effect of LF extract on the histopathological changes of organs in high fat/high sucrose diet plus STZ-induced diabetic mice. Each tissue was stained with H&E, and observed by microscope (original magnification x200). A, pancreas, B, lung, C, liver. Normal, normal group; STZ-Con, streptozotocin-induced diabetic group; STZ-LF, Lycii Fructus 300 mg/kg-administrated group.

2) 신장 조직에서 염색에 따른 조직학적 변화

저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서의 신장조직에서 병리조직학적 변화를 H&E 염색 및 PAS, Trichrome 염색으로 관찰하였다(Fig. 6)

먼저, H&E 염색의 경우 정상군(Normal)에서는 정상적인 피질 부위 사구체와 신장 사구체(renal glomerulus)의 고른 분포 및 사구체 내 혈관극(vascular pole)등이 잘 보존되어 있어 병리학적 소견을 나타내지 않았으나, 대조군(STZ-Con)에서는 사구체 비후(hypertrophy)와 함께 염증세포의 침윤과 형태적 손상이 관찰되었다. 특히 현저한 사구체의 수적 감소가 관찰되었다. 또한 실험군(STZ-LF)에서는 대조군에 비해 신장조직의 병리적 변화가 감소되는 것으로 관찰되었으며 사구체의 형태학적 손상도 감소하는 것으로 나타났다.(Fig. 6A). 한편, PAS 염색을 통하여 신장조직에서의 염증세포의 침윤을 확인 한 결과 정상군(Normal) 및 실험군(STZ-LF)은 메산지움(mesangium) 세포의 증식이나 세포성 반월상이 관찰이 되지 않았지만, 대조군(STZ-Con)에서는 메산지움 세포의 증식과 사구체에서의 다량의 염증세포 침윤을 관찰하였다 (Fig. 6B). 그리고 신장 조직에서의 콜라겐 침착, 및 혈전 존재 등 섬유화 정도를 비교하기 위해 trichrome 염색을 실시하였다. 그 결과, 정상군(Normal) 및 실험군(STZ-LF)의 신장조직에서는 콜라겐 침착에 따른 섬유화가 관찰되지 않았으나, 대조군(STZ-Con)에서는 신장조직에서의 섬유화가 심해지는 것으로 나타났으며, 특히 모세혈관벽을 따라 내피세포의 하면에 과립상 물질의 침적을 증가시켰으며 사구체의 형태적 변형이 심하게 일어나는 것으로 나타났다(Fig 6C).

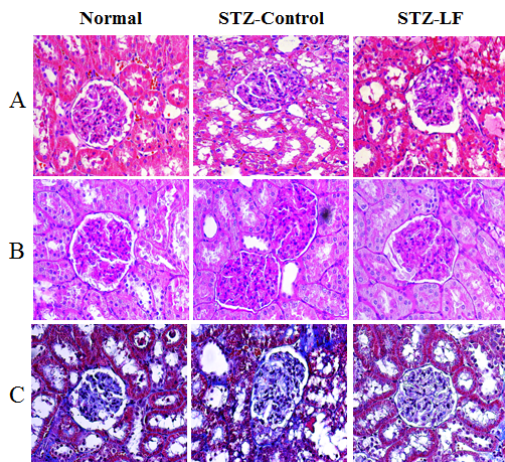


Fig. 6. The Effect of LF extract on the histopathological change of kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Kidney tissues were isolated, sectioned and then stained with H&E(A), PAS(B), Trichrome stain(C). Normal, normal group; STZ-Con, streptozotocin-induced diabetic group; STZ-LF, Lycii Fructus 300 mg/kg-administrated group;. Original magnification x200.

고찰

현대 우리 사회는 서구화된 식생활의 변화로 인하여 대사성질환이 급증하는 추세이다. 특히 당뇨병은 체내의 인슐린 생성 분비 장애와 말초조직에 대한 인슐린 작용이 충분하게 일어나지 못하므로, 탄수화물, 지방, 단백질 등의 생체 내 대사 기능의 이상을 초래하는 만성적인 대사성 질환이다¹⁷⁾. 이러한 당뇨병에서 지질대사의 이상은 지방조직에 있는 유리 지방산의 분해를 증가시킴으로써 간에서의 지방합성과 VLDL (Very Low Density Lipoprotein)의 생성 및 혈중 중성지방 수치를 증가시키며, HDL-콜레스테롤을 감소시킨다. 이와같이 당뇨병은 지질대사 이상을 야기하여 이로 인하여 고혈당, 고지혈증 등 여러 합병증을 동반한다^{18,19)}.

한의학에서 당뇨병은 소갈(消渴)이라 하여 인체 음양과 오행의 조절시스템 이상에 따른 만성 소모성 질환으로 보고 있다. 소갈은 췌음병(厥陰病)으로 삼초부위(三焦部位)에 발현한 전신질환으로 음식부절(飲食不節), 정지부조(情志不調), 번로과도(煩勞過度), 약물중독(藥物中毒), 병후혈쇠(病後血衰), 기후기상부조(氣候氣象不調)로 인해 발생하며, 음식이 쉽게 소화되어 먹고 난 후 급방 배고픔을 느끼는 소곡선기(消穀善飢), 갈증이 심해서 물을 많이 마시는 갈이다음(渴而多飲)²⁰⁾ 등의 증상이 현대의학에서의 당뇨병과 유사한 것으로 보고 있다. 특히 소갈의 증상이 만성적인 질환으로 되면서 나타나는 소갈전변증(消渴轉變證)은 현대의학적인 관점에서 당뇨병의 만성 합병증 증상들과 유사한 것으로 보아진다²¹⁾. 본 연구에서는 이러한 한의학적 당뇨에 대한 해석을 바탕으로 한방임상에서 사용되어지고 있는 구기자에 대한 추출물을 제조하여 당뇨병 개선효과를 확인하였다. 즉 저용량 STZ를 반복 투여하여 당뇨를 유발한 당뇨 흰쥐에서 구기자의 물추출물을 4주동안 300 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며 실험기간 동안 체중과 수분, 사료 섭취량, 혈당의 변화와 혈청 내 포도당(glucose), 총콜레스테롤 (total-cholesterols), 중성지방 (triglyceride), HDL-콜레스테롤 등의 혈액마커 분석 및 신장, 간, 폐 조직

의 구조적 변화를 조사하였다.

당뇨가 유발된 경우 인슐린 생성 부족이나 작용의 저하로 인하여 당대사에 의한 에너지 대사의 불균형이 발생하고 이로 인하여 체중이 감소된다고 알려져 있으며, 이러한 증상은 STZ의 저용량 반복투여 동물모델에서 4주이상 만성적으로 당뇨가 진행될 경우 시간이 경과함에 따라 체중이 현저히 감소된다고 알려져있다^{22,23)}. 본 연구에서도 저용량 STZ를 반복 투여하였을 때 시간에 의존적으로 현저한 체중 감소와 함께 섭식량(多食)과 음수량(多飲)증가 등 생리적 변화를 유발하였다. 그러나 구기자 추출물의 투여는 체중의 변화는 크게 증가시키지는 못하였지만 섭식량과 음수량에서는 시간이 경과함에 따라 감소하는 것으로 나타났다.

당뇨병은 합병증으로서 이차성 고지혈증을 유발하는데 이는 인슐린의 작용이 저하되거나 인슐린 저항성으로 인슐린의 생리적 기능이 충분하게 일어나지 못하여 혈액 내 중성지방이 증가한다고 보고되어있다¹⁷⁾. 본 연구에서 결과 구기자 추출물은 STZ 저용량 반복투여 당뇨유발 흰쥐에서 혈액 내 혈중 고밀도 지단백(HDL-CHO)의 농도를 증가시키고, 중성지방(TG)과 총콜레스테롤(CHO) 농도를 감소시킴으로써 지방대사 조절을 통해 인슐린의 생리적 개선효과를 가지는 것으로 나타났다.

저용량 STZ의 반복투여는 insulinitis에 의한 베타세포 사멸 (apoptosis)로 내분비세포의 사멸, 베타세포의 부분 증식 등의 유형 관찰에 용이하다²⁴⁾. 본 연구에서도 췌장조직의 경우 정상군에서 알파세포와 베타세포의 경계면이 뚜렷하며, 세포와 세포사이의 조밀도가 높아 조직의 구조적인 손상을 관찰할 수 없었으나, 대조군에서는 췌장의 구조적 손상과 더불어 랑게르한스섬도 정상군에 비하여 확연하게 수직감소를 유발하는 것으로 나타났다. 반면, 구기자 추출물을 투여한 실험군에서는 췌장의 구조적 손상과 더불어 조직병리적 변화를 감소시켰으며, 랑게르한스섬의 수직 증가도 관찰할 수 있었다.

한편, 한의학적 당뇨병의 치료원리는 인체 전체를 살펴 병증의 복합적인 근본원인을 치료하는 것으로 인체 내 항상성을 회복하는 근본적 치료를 하게 된다. 즉, 본치(本治)로서 비신양허(脾腎陽虛), 간신음허(肝腎陰虛)를 치료하고, 표치(標治)로서 위, 폐의 기음양허(氣陰兩虛)를 치료하는 것이다²⁵⁾. 한의학에서 귀경(歸經)은 인체 내 어느 장부에 주로 작용하는가에 대한 것으로 하소 약물의 귀경(歸經)은 간(肝), 신(腎)으로 보고 있다. 본 실험에 사용된 구기자는 자보약(滋補藥)으로 쓰이며 귀경은 간(肝), 신(腎), 폐(肺)로 이의 귀경을 조직 병리학적 관찰을 통하여 구기자의 귀경의 역할을 평가하였다.

당뇨병은 폐의 구조적 손상을 나타낸다고 보고되어있는데, 산화적 스트레스에 손상받기 쉬운 폐 조직은 염증반응과 더불어 비정상적인 폐기능 혹은 폐질환을 야기시킬 수가 있다²⁶⁾. 본 연구에서도 저용량 STZ의 반복투여에 의해 폐 조직에서 세기관지의 비후와 다량의 염증세포 침윤, 폐포의 구조적 손상과 협착등 병리적 변화가 나타난 것을 확인 할 수 있었으며, 이들의 변화가 구기자 추출물 투여 후 개선되는 것을 확인 하였다. 이는 구기자 추출물이 폐 조직의 구조적 변화를 억제함으로써 당뇨병에 의하여 손상된 폐조직과 염증반응을 억제 할 수 있음을 의미한다.

간 조직 변화에서 STZ의 반복투여는 확연한 조직병리학적 소견이 나타나지는 않았지만, 간문맥과 간동맥의 손상과 간세포사이의 밀도 감소, 염증세포 침윤 등이 관찰되어 기존 보

고 와 일치하는 것을 알 수 있었다²⁷⁾.

또한 신장의 손상여부를 조직병리화학적 변화로 확인하고자 H&E, PAS, trichrome 염색을 하여 관찰하였다. STZ 저용량 반복투여는 사구체 비후와 다량의 염증세포 침윤 및 이형상피세포 형성 등의 형태적 손상을 유발하였고 사구체 수가 감소되었다. 즉, 대조군에서는 당뇨로 인하여 사구체 기저막의 비후가 나타나고 fibronectin과 같은 정상 단백질의 발현 증가 및 콜라겐의 축적이 나타나 사구체의 손상이 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 trichrome 염색을 통하여 기질에 콜라겐 축적이 나타났다. 이는 기존에 보고되었던 연구자료에서도 나타난 결과로 STZ-유도 당뇨동물의 신장조직에서 TGF의 발현 증가가 뚜렷이 나타나고 이는 사구체 기저막 비후, 섬유화 유도, 사구체 경화증 등을 유발한다고 알려져 있다²⁸⁾. 본 연구에서 구기자 추출물은 신장 조직에서도 사구체의 수적 감소, 형태적 변형 및 손상에 대하여 감소 효과를 가지고 있었으며, 특히 콜라겐 축적으로 인한 섬유화를 억제시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 저용량 STZ 반복투여로 당뇨병이 유발된 흰쥐에서 구기자 추출물의 투여는 대조군에 비해 혈당과의 증가를 유의적으로 감소시켰으며, 폐와 췌장, 간 및 신장조직에서의 구조적 손상을 감소시킴으로써 이들의 기능개선을 통해 당뇨병을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 이러한 결과를 통해 구기자는 한의학적으로 귀경에 해당하는 간(肝), 신(腎), 폐(肺)의 약물로 신, 폐에서 주로 작용하고 있음을 의미하며, 귀경장부를 조절함으로써 당뇨병의 진행 단계를 조절 할 수 있으며, 향후 현대 약리에서 말기 당뇨병이나 당뇨합병증의 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 STZ 저용량 반복투여에 의한 당뇨흰쥐 모델에서 구기자 추출물의 당뇨병 개선효과를 혈액 및 주요 표적 장기에서 조직학적 변화를 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 구기자 추출물은 저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서 체중감소, 섭취량과 음수량의 증가에 미미한 억제효과를 나타내었다.
2. 구기자 추출물은 저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서 혈청 내 포도당과 총콜레스테롤, 중성지방의 양을 유의적으로 감소시켰으며, HDL-콜레스테롤을 유의적으로 증가시켰다.
3. 구기자 추출물은 저용량 STZ 반복투여에 따른 당뇨 흰쥐에서 폐, 췌장, 신장, 간 조직의 구조적 손상을 감소시켰다.

이상의 결과로부터 구기자 추출물은 STZ 저용량 반복투여에 의해 당뇨가 유발된 흰쥐에서 혈당조절과 지질대사 개선 및 췌장과 신장 조직 보호를 통해 당뇨병을 개선시킬 수 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 교내 자유연구 지원사업의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Nepom GT. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes*. 1990 ; 39(10) : 1153-7.
2. Im JI. Recent trends in diabetes research. *Health Industry Technology Trends*. 2003 ; 1 : 28-38.
3. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance - a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991 ; 14 : 173-94.
4. Textbook of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, the National History Compilation Committee, Supplementary hanuisin new science [supplement]. Seoul : Jipmundang. 2010 : 332-341, 567-572.
5. Sunil C, Duraipandiyar V, Agastian P, Ignacimuthu S. Antidiabetic effect of plumbagin isolated from *Plumbago zeylanica* L. root and its effect on GLUT4 translocation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2012 ; 50(12) : 4356-63.
6. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003 ; 133(4) : 1081-7.
7. The whole country a college of Oriental medicine The joint textbook publish commission compilation. *Herbology*. Seoul : Younglimsa. 2007 : 277, 654-5.
8. Seo HJ, Jun SJ, Lee MY. Effects of Lycii fructus extract on Experimentally Induced Liver Damage and Alloxan Diabetes in Rabbits. *J Korean Soc Food Nutr*. 1996 ; 15(2) : 136-43.
9. Kim OK. Antidiabetic and Antioxidative Effect of Lycii fructus in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Kor J Pharmacogn*. 2009 ; 40(2) : 128-36.
10. Jeon YH, Moon JW, Kweon HJ, Jeoung YJ, An CS, Jin HL, Hur SJ, Lim BO. Effects of Lycii fructus and Astragalus membranaceus Mixed Extracts on Immunomodulators and Prevention of Diabetic Cataract and Retinopathy in Streptozotocin-induced Diabetes Rat Model. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2010 ; 18(1) : 15-21.
11. Liu Z, Barrett EJ, Dalkin AC, Zwart AD, Chou JY. Effect of acute diabetes on the rat hepatic glucose-6-phosphatase activity and its messenger RNA level. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 ; 38 : 680-90.
12. Vats V, Yadav SP, Grover JK. Ethanolic extract

- of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J Ethnopharmacol*, 2000 ; 90 : 155-64.
13. Lim SJ, Han HK, Ko JH. Effects of Edible and Medical Plants Intake on Blood Glucose, Glycogen and protein Levels in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *J Korean Nutr*, 2003 ; 36 : 981-9.
 14. Lee BY, Kim EJ, Choi HD, Kim YS, Kim IH, Kim SS. Physicochemical properties of Boxthorn (*Lycii fructus*) hot water extracts by roasting conditions. *Korean J Food Sci Technol*, 1995 ; 27(5) : 768-72.
 15. Chung HK, Choi CS, Yang EJ, Kang MH. The effect of *Lycii fructus* beer intake on serum lipid profiles and antioxidant activity in rats. *Korean J Food Culture* 2004 ; 19(1) : 52-60.
 16. Joo IS, Sung CK, Oh M, Kim CJ. The influence of *Lycii fructus* extracts on the growth and physiology of microorganism. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 1997 ; 62(4) : 625-31.
 17. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Conel RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 2003 ; 37 (4) : 649-61.
 18. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev*, 2007 ; 8(1) : 21-34.
 19. Al-Shoumer KA, Al-Asousi AA, Doi SA, Vasanthi BA. Serum leptin and its relationship with metabolic variables in Arabs with type 2 diabetes mellitus. *Ann Saudi Med*, 2008 ; 28(5) : 367-70.
 20. Wang B(王永). *Hwangjaenaegyungso-mun(黄帝内经素问)*. Seoul : Daesung Munhwa publishing company, 1994 : 236-7, 284-8.
 21. Jang HS, Yu JS, Song BY. Recent research trends in Korean Medicine treatment of diabetes mellitus. *J Pharmacopuncture*, 2008 ; 11(4) : 65-77.
 22. Lozoya X, Reyes-Morales H, Chávez-Soto MA, Martínez-García Mdel C, Soto-González Y, Doubova SV. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J Ethnopharmacol*, 2002 ; 83(1-2) : 19-24.
 23. Oh TW, Kang SY, Park YK. Histological analysis of five organs in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbol*, 2013 ; 28(6) : 39-45.
 24. TW Oh, SY Kang, KH Kim, MY Song, YK Park. Anti-diabetic effect of medicinal plants used for lower wasting-thirst in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbol*, 2013 ; 28(5) : 53-60.
 25. Nukatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Enhancement by streptozotocin of O₂-radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*, 1988 ; 239(2) : 295-8.
 26. Popov D, Simionescu M. Structural and transport property alterations of the lung capillary endothelium in diabetes. *Ital J Anat Embryol*, 2001 ; 106 : 405-12.
 27. Kim HW, Ha TH, Cho MR, Cho SI. Effects of Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01 (HRDM-01) on Liver and Serum Lipid Level in Diabetic Rats. *Kor J Herbol*, 2010 ; 25(3) : 117-21.
 28. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 2001 ; 44 : 1957-72.