

生津養血湯加味方과 玫瑰花가 streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐의 췌장에 미치는 영향

홍광표, 나창수, 장경선, 김희철, 박민희, 김정상
동신대학교 한의과대학 한의학과

Effects of *Saengjinyanghyutang-gamibang* and *Rosa rugosa* on the Pancreas in the Streptozotocin Treated Mice for Induction of Diabetes

Kwang-Pyo Hong, Chang-Su Na, Kyung-Sun Jang, Hee-Cheol Kim, Min-Hee Park, Jeong-Sang Kim

College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives : This study has been carried out to investigate the effects of the *Saengjinyanghyutang-gamibang* and *Rosa rugosa* extracts on pancreas of the hyperglycemia mice induced with streptozotocin.

Methods : We examined immunohistochemistry for insulin and COX-2, ultrastructural changes of acini by electron microscope, and changes of the blood glucose and BUN levels.

Results : The β -cells on Langerhnan's islet were destructed by administration of streptozotocin, so that few insulin-positive cells were observed in the control group. However, a lot of insulin-positive cells were observed in the experimental groups. These cells had recovered from the damage. As a result of COX-2 immunostain, COX-2 expression were highest in the control group other than the *Saengjinyanghyutang-gamibang* and *Rosa rugosa* extracts administered groups. As the electron microscopical observation, the centroacinar cells and acini of pancreas were destructed or damaged by administration of streptozotocin in the control group, but these recovered from the damage in the other experimental groups. The levels of serum glucose were decreased remarkably on the *Rosa rugosa* and *Saengjinyanghyutang-gamibang* extracts administered groups compared with control group.

Conclusions : These results suggest that administration of the *Rosa rugosa* and *Saengjinyanghyutang-gamibang* extracts to the mice reduced the damage induced by streptozotocin. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(4):79-89)

Key Words: *Saengjinyanghyutang-gamibang*, *Rosa rugosa*, streptozotocin, hyperglycemia, insulin-positive cells, COX-2 positive cells

· 접수 : 2001년 8월 30일 · 채택 : 10월 7일
· 교신저자 : 김정상, 전남 나주시 대호동 252 동신대학교 한의과대학 해부학교실
(Tel. 061-330-3512 E-mail: jskim@red.dongshinu.ac.kr)
· 본 연구는 농림기술개발 연구과제의 첨단기술개발사업 (200017-3)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

서론

당뇨병(Diabetes Mellitus)이란 인슐린분비의 절대

적 또는 상대적 부족이나 인슐린 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과 감소로 인하여 발생하는 고혈당 상태 및 대사장애가 지속되는 질환으로¹³⁾ 원인에 따라 췌장 β세포의 파괴에 의한 인슐린 의존형 당뇨병(IDDM)과 β세포에서의 인슐린 분비이상 혹은 인슐린 표적세포에서의 인슐린 작용 이상에 의한 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM)으로 분류하고 있다²⁴⁾. 韓醫學에서는 당뇨병에서 發顯되는 症狀이 消渴과 類似하기 때문에 “消穀善飢 渴而多飲”한 病證인 消渴의 範疇로 보고있으며, 消渴의 명칭은 消, 脾, 肺消, 消, 風消, 消中等으로 쓰여져 왔는데, 消渴의 病因에 대해서는 《內經》에서 “二陽結謂之消, 肥美之所發, 怒則氣上逆, 五臟皆柔弱, 二陽結謂之消”라 하여 飲食不節, 情志失調, 五臟脆弱, 胃·大腸의 燥熱結聚 등으로⁵⁾, 張⁶⁾은 胃熱腎虛로, 孫⁷⁾은 三焦熱結로 因한 五臟乾燥로, 李⁸⁾는 脾腎虛로 보았으며, 消渴의 치료는 消渴이 주로 陰虛, 燥熱에 의하여 발생되므로 益氣, 養陰, 淸熱生津해야 한다고 하였다⁹⁾.

生津養血湯은 瀉心肺之火하고 補陰血生津하는 作用으로 多飲, 口渴하는 上消에 活用되는 處方¹⁰⁾으로 清代 沈¹¹⁾의 《沈氏尊生書·雜病源流犀燭卷十七 三消源流》에 “上消者 舌赤裂 咽如燒 大渴引飲 日夜無度……通治上消宜生津養血湯”이라 하여 처음 기재된 이후 歷代 醫家들에 의하여 消渴의 治療에 사용되어 왔다¹¹⁻¹³⁾. 生津養血湯에 대한 최근의 실험적 연구로는 金 등¹⁴⁾이 고혈당 쥐의 혈중지질성분에 미치는 영향에, 金 등¹⁵⁾이 고혈당 쥐의 췌장 효소활성에 미치는 영향에 대한 研究로 그 유효성을 보고한 바 있다. 玫瑰花(Rosa rugosa, Thunbergii)는 海棠花라는 이름으로 더 잘 알려진 약으로 疏肝解鬱의 效能이 있어서 肝胃不和로 인한 胸脇脹痛, 胃脘疼痛, 不思飲食 등에 使用되었고, 神經性胃炎, 慢性胃炎, 慢性肝炎 등에 適用할 수 있으며, 또한 理氣和血, 收斂作用이 있어서 月經不調, 損傷瘀血, 泄瀉에도 쓸 수 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

玫瑰花 뿌리가 糖尿治療에 쓰이는 것이 많이 알려진 이후로 이에 대한 研究도 施行되었는데, 박¹⁹⁾, 천²⁰⁾, 손²¹⁾ 등에 의하면 海棠花 뿌리가 糖尿에 實驗적으로 有效함을 보고하고 있다.

본 연구에서는 上消의 治療에 有效한 生津養血湯에 玫瑰花根을 加味한 處方이 당뇨에 미치는 효과를 실험적으로 구명하기 위하여, 本 研究者들은 streptozotocin을 投與하여 高血糖 생쥐를 誘發시킨 다음 生津養血湯에 玫瑰花根을 가미한 처방과 花根의 煎湯液을 투여하여 혈당 및 臟腑에 미치는 影響을 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중 25g내외의 웅성 생쥐(ICR strain)를 사용하였다. 실험군은 대조군, 매괴화 투여군과 생진양혈탕가미방 투여군으로 나누었다.

2) 약제

매괴화 투여군은 매괴화 36.75g에 감초 1.875g를 가미하였으며, 생진양혈탕가미방투여군의 약제 처방은 ‘方藥合編’에 수재된 生津養血湯에 玫瑰花를 加味하였으며 1첩의 처방내용과 분량은 다음과 같다.

韓藥名	生藥名	重量
當歸	Angelicae gigantis Radix	3.750
白芍藥	Paeoniae Radix	3.750
生地黃	Rehmanniae Radix	3.750
麥門冬	Liriopsis Tuber	3.000
川芎	Cnidii Rhizoma	3.000
黃連	Coptidis Rhizoma	2.625
天花粉	Trichosanthis Rhizoma	1.875
知母(蜜炒)	Anemarrhenae Rhizoma	1.875
黃柏(蜜炒)	Phellodendri Cortex	1.875
蓮肉	Nelumbo Semen	1.875
烏梅	Mume Fructus Praeparatus	1.875
薄荷	Menthae Folium	1.875
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.875
玫瑰花	Rosa rugosa	36.750
總量		73.500

2. 방법

1) 당뇨유발

실험에 사용한 모든 생쥐는 정상적인 사육환경에서 2주 이상 적응시킨 후 12시간 동안 절식시킨 다

음 각각의 쥐에 streptozotocin(STZ) 50mg/kg 씩 2일간 복강 주사하였다.

2) 약물 추출

본 실험에 사용하는 약물은 증류수 1000ml과 함께 약탕기에 넣고 3시간 동안 전탕하였다. 전탕액 만을 취하여 고속원심분리기(Centricon T-42K, Kontron)로 20분간 원심분리(5,000rpm)하여 침전물을 제거한 후 rotatory evaporator(Buchi, Netheland)를 사용하여 240 ml로 농축하였다.

3) 약물 투여

대조군은 췌장손상을 유발한 다음 약물을 처치하지 않고 자연 치유과정을 거치게 하였다. 약물 처치군은 추출한 각각의 약물을 0.4ml/day 씩 21일간 구강투여 하였다.

4) 면역조직화학적 검사

생쥐의 췌장조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 췌장조직을 paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5 μm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 100%, 90%, 80% ethanol 과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 paraffin을 제거하였다. 다음날 pH 7.2, 0.1M의 phosphate buffer saline (0.9% NaCl) 용액에 하룻밤 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 insulin 항체와 cyclooxygenase-2(COX-2) 항체를 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex (ABC) reagent (Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS용액에서 15분간 세척하였다.

DAB 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20

초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

5) 전자현미경 관찰

췌장조직의 일부를 절취하여 전고정액 속에서 1mm³ 크기로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde(phosphate buffer, pH 7.2)로 2시간 동안 전고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide(OsO₄)로 2시간 후고정 한 다음 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 세척후 시료들은 상승농도 순의 에탄올로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후 Epon-Araldite 혼합액으로 포매하였고 60℃ 오븐에서 30시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1μm 두께로 절편을 제작하여 1% toluidine blue로 hot plate(60℃)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학현미경으로 관찰하여 조직을 확인한 다음 동일한 부위에서 50nm두께로 초박절편을 제작하여 cooper grid에 부착하였고, uranyle acetate 와 lead citrate로 이중 염색한 다음 JEM 100 CX- II 투과형 전자현미경(80KV)으로 관찰하였다.

6) 혈당측정

4-aminoantipyrin 17.5mg과 0.2ml의 glucose oxidase를 가한 것을 준비하고(A시약), phenol 0.2g과 NaCl 0.9g을 100ml의 증류수에 녹인 것을 준비하였다(B시약). Glucose standard는 glucose 400mg/dl 를 준비하여, serial dilution한 후 흡광도를 측정하였다. 그리고 각 sample 5μl을 혼합하여 10분간 상온에 방치한 후, B시약 1000μl를 넣었다. 이후 510nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

7) BUN 측정

40ml의 증류수에 NaOH 1.25g을 녹인 다음 sodium hypochloride 2ml을 가하고 증류수로 총 50ml을 만들었다(A 시약). Phenol 2.5g과 sodium nitroprusside 14.25mg을 증류수에 녹여 50ml로 만들었다(B 시약). EDTA Na₂ 500mg을 glycerin 20ml과 증류수 25ml에 녹인 다음 4% NaOH로 pH 6.5로 맞춘 다음 증류수로 총 50ml을 만들고, 이중 10ml에 urease type III 3mg

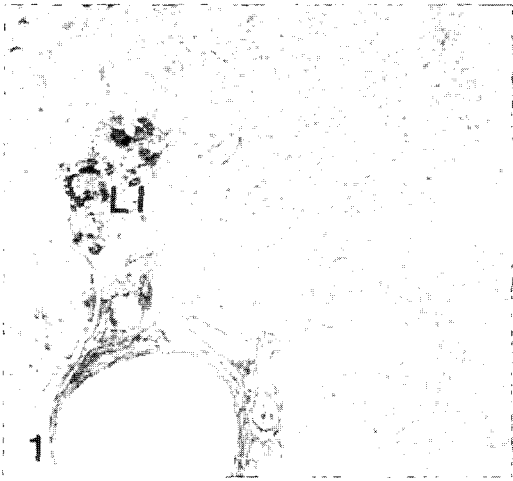


Fig. 1. Light micrograph of pancreas administered streptozotocin to mouse. A few of insulin-immunoreactive β -cells were observed in the islet of Langerhans(LI). Insulin-immunostain, $\times 200$.

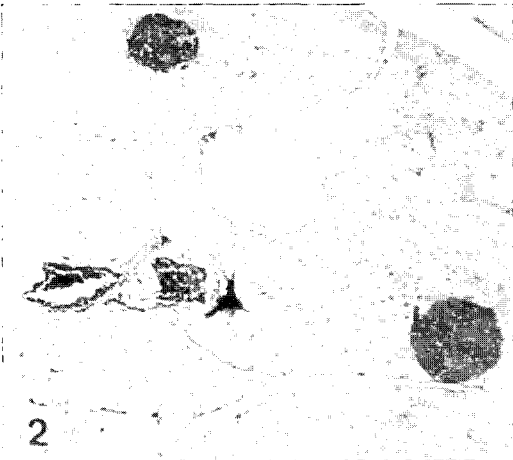


Fig. 2. Light micrograph of pancreas administered the extract of *Rosa rugosa* to mouse. Stronger staining for insulin can be found in the two islet of Langerhans(LI) surrounded by exocrine acini. This result demonstrated that most of the cells at the islet of Langerhans are insulin-secreting β -cells. Insulin-immunostain, $\times 200$.

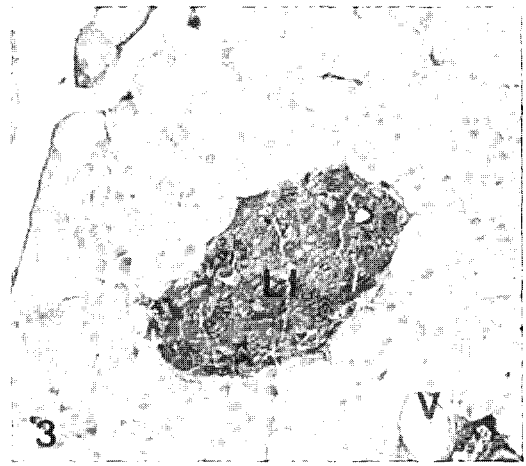


Fig. 3. Light micrograph of pancreas administered the extract of *Saengjinyanghyutang-gamibang* to mouse. The most strongest staining for insulin can be found in the islet of Langerhans(LI) near the vessel(V). Insulin-immunostain, $\times 200$.

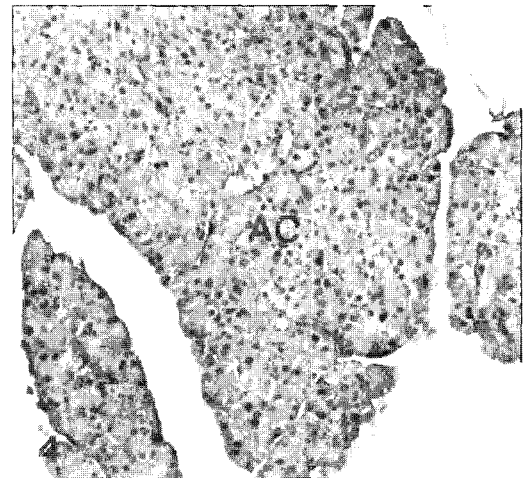


Fig. 4. Light micrograph of pancreas administered streptozotocin to mouse. The acini (AC) were the most strongest stained for COX-2 compared with any other groups. COX-2 immunostain, $\times 200$.

을 녹였다(C 시약). Urea standard는 urea 200mg/dl를 준비하여, serial dilution 한 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 각 sample 5 μ 에 C 시약 50 μ 를 혼합하여 15분간 상온에 방치한 후, 여기에 A 시약 100

μ , B 시약 100 μ 를 넣어 15분간 상온에 방치하였다. 여기에 증류수 1000 μ 를 넣은 후 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

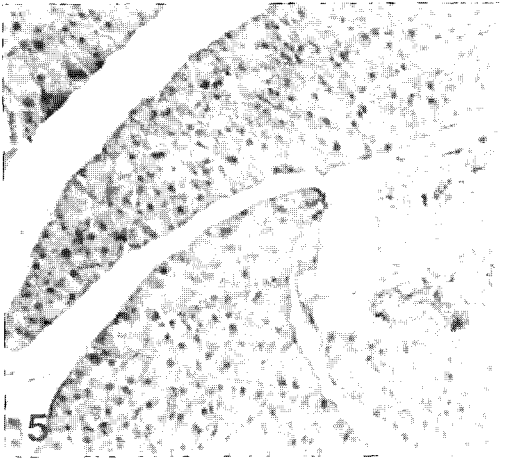


Fig. 5. Light micrograph of pancreas administered the extract of *Rosa rugosa* to mouse. The COX-2 positive cells not found. COX-2 immunostain, × 200.

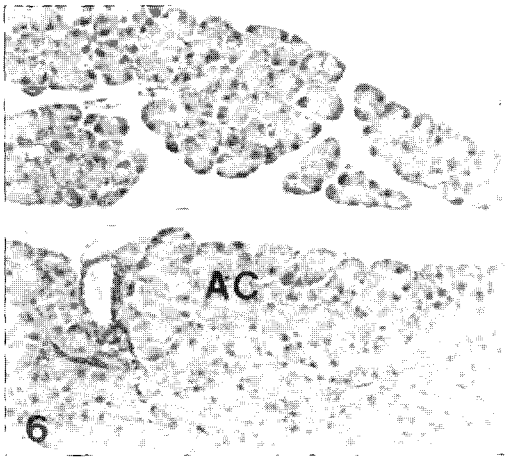


Fig. 6. Light micrograph of pancreas administered the extract of *Saengjinyanghyutang-gamibang* to mouse. Acini(AC) were very weakly stained for COX-2. COX-2 immunostain, × 200.

결 과

1) Insulin-면역조직화학

생쥐에 streptozotocin을 복강 투여하여 당뇨를 유발시킨 대조군 췌장 조직의 췌장섬에서는 insulin에 면역반응성을 보이는 β -cells이 소수 관찰되었으나 (Fig. 1), 매괴화 추출액을 투여한 실험군에서는 insulin에 강한 면역반응성을 나타내는 β -cells이 췌장섬 대부분에서 관찰되었다(Fig. 2). 생진양혈탕가미방 추출액을 투여한 실험군 췌장섬들은 매괴화 투여군에 비하여 보다 강한 insulin 면역반응을 보여주었다 (Fig. 3).

2) COX-2 면역조직화학

생쥐에 streptozotocin을 복강 투여하여 당뇨가 유발된 생쥐 췌장조직의 COX-2에 대한 면역반응성을 관찰하였다. 대조군 췌장의 샘파리세포(acinar cells)는 전반적으로 COX-2에 대한 면역반응성이 나타났으나 소엽의 중앙부위는 면역반응성이 다소 약하였다. 또한 췌장 조직의 소엽속관(intralobular duct)과 소엽사이관(intercalated duct) 상피세포의 세포막들이 COX-2에 대한 보다 강한 면역반응성을 보여주었다(Fig. 4). 매괴화 투여군(Fig. 5)과 생진양혈탕가미방 투여군(Fig. 6)에서는 COX-2에 대한 면역반응성이 소엽속관과 소엽사이관에서 아주 미약하게 나타났다.

3) 전자현미경 관찰

Streptozotocin으로 유발된 대조군 생쥐 췌장의 샘파리세포는 과립형질내세포가 발달되어 있었으나 세

Table 1. The effects of *Rosa rugosa* and *Saengjinyanghyutang-gamibang* on the Serum Glucose and BUN Levels in STZ-induced Hyperglycemic Mice

Drug	Glucose(mg/dl)		BUN(mg/dl)	
	Mean ± S.E	Prob> T	Mean ± S.E	Prob> T
Control	365.33 ± 91.01		32.77 ± 2.16	
Drug A	169.43 ± 42.00	0.1901	25.15 ± 0.49	0.0749
Drug B	179.56 ± 73.36	0.2532	32.31 ± 2.99	0.9111

Drugs were treated as described in materials and methods. Mean ± S.E : Mean ± standard error. Prob> | T | : Values in the T test. control, group of treated with streptozotocin; Drug A, group of administered with *Rosa rugosa*; Drug B, group of administered with *Saengjinyanghyutang-gamibang*.

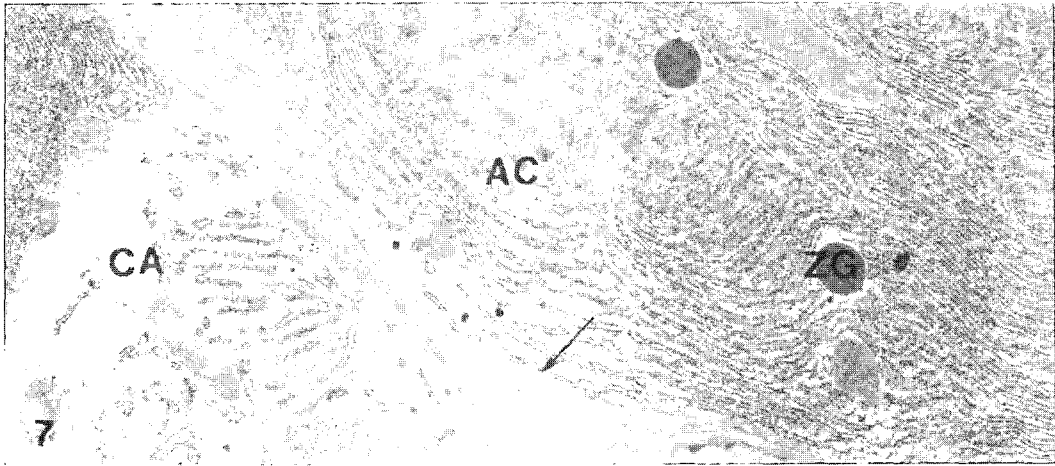


Fig 7. Electron micrograph of pancreas administered streptozotocin to mouse. A acinar cell(AC) was partially bordered by three centroacinar cells(CA). The centroacinar cell contained destroyed mitochondria and rough endoplasmic reticulum. A lot of electron-lucent vesicles are observed in the peripheral of cytoplasmic membrane. ZG, zymogen granule. × 8,000.

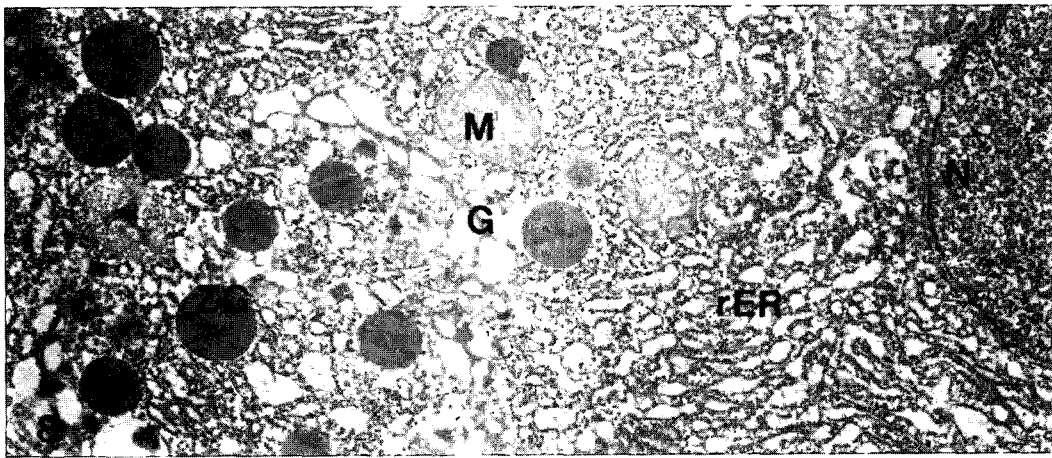


Fig. 8. Electron micrograph of acinar cell administered the extract of *Rosa rugosa* to mouse. Rough endoplasmic reticulum (rER) and Golgi complex(G) were very developed, and a lot of zymogen granules(ZG) are observed. M, mitochondria; N, nucleus. × 8,000.

포막 인접부위에서는 전자밀도가 낮은 물질을 함유한 소포들이 다수 관찰되었다. 효소원과립(zymogen granule)들은 실험군에 비하여 소수 관찰되었다. 중심 샘파리세포(centroacinar cells)는 전반적으로 과립형질내세망이 발달해 있었으나, 일부 세포들에서는 파괴된 과립형질내세망과 소수의 사립체들이 관찰될 뿐 대부분의 세포질들이 손상되어 괴사된 형태를 보

여주었다(Fig. 7). 매괴화 추출액을 투여한 실험군의 샘파리세포는 핵의 핵막이 둥글고 핵질이 고루게 발달해 있었다. 세포질에서는 내강이 다소 팽대된 과립형질내세망과 골지체가 매우 발달해 있었으며, 전자밀도가 다소 낮은 효소원전과립들과, 전자밀도가 높은 효소원과립들이 세포질내에 충전되어 있었다(Fig.8). 생진양혈당가미방 추출액을 투여한 실험군의

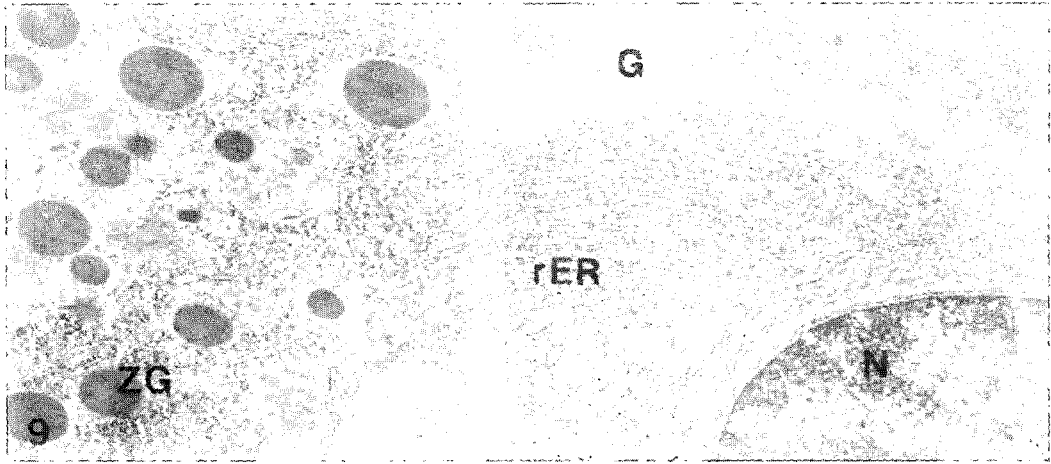


Fig. 9. Electron micrograph of acinar cell administered the extract of *Saengjinyanghyutang-gamibang* to mouse. Acinar cell was filled with zymogen granules(ZG), and Golgi complex(G) and a number of mitochondria(M) were observed. N, nucleus; rER, rough endoplasmic reticulum. $\times 8,000$.

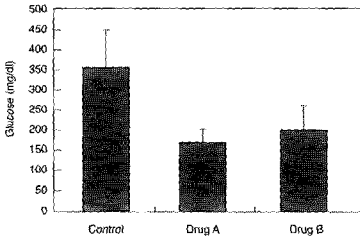


Fig.10. The Changed figure of glucose content in table 1.

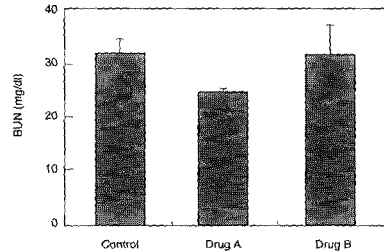


Fig.11. The Changed figure of BUN content in table 1.

샘파리세포는 핵의 핵막이 둥글고 핵질과 염색질이 매우 고루게 관찰되었다. 세포질에서는 과립형질내 세망이 매우 발달해 층판을 이루고 있었으며, 유리리보소체들이 세포질 전반에 걸쳐 나타났다. 전자밀도가 높은 효소원과립들이 세포질내에 충만되어 있었으나 골지체는 매괴화 투여군에 비해 미약하게 발달해 있었다(Fig. 9).

4) Glucose와 BUN의 변화

Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 생쥐의 대조군과 각각의 약물을 투여한 실험군의 혈청을 얻어 glucose와 혈액요소질소(BUN)를 측정하였다. 그 결과 혈당은 대조군(365.33 ± 91.01 , mg/dl)에 비하여 매괴화 추출액 투여군(169.43 ± 42.00 , mg/dl)과 생진양혈당가미방 투여군(179.56 ± 73.36 , mg/dl)에서 현저히

감소하였는데, 매괴화 투여군이 가장 낮게 나타났다 (Table 1, Figs. 10, 11). BUN은 대조군(32.77 ± 2.16 , mg/dl)과 생진양혈당가미방 추출액 투여군(32.31 ± 2.99 mg/dl)에서는 비슷하여지만 매괴화 추출액 투여군(25.15 ± 0.49 mg/dl)에서는 다소 낮게 나타났다.

고 찰

生津養血湯은 瀉心肺之火하고 補陰血生津하는 作用으로 多飲, 口渴하는 上消에 活用되는 處方¹⁰⁾ 본 처방은 當歸, 白芍藥, 生地黃, 川芎, 麥門冬, 黃連, 天花粉, 知母, 黃柏, 蓮肉, 烏梅, 薄荷, 甘草로 구성되었으며, 각각의 藥效를 살펴보면 當歸는 補血活血, 潤燥, 養腎血하고, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛散瘀하고, 生

地黄은 淸血養血하고, 白芍藥은 養血斂陰, 緩急止痛하고, 麥門冬은 生津, 潤肺, 瀉熱除煩하고, 黃連은 瀉心火, 淸熱하고, 天花粉은 降火潤燥解渴하고, 知母는 壯水淸金, 潤腎滋陰, 止渴除煩하고, 黃栢은 瀉腎火하고, 蓮肉은 益氣淸心, 補中養神하고, 烏梅는 斂肺, 生津止渴하고, 薄荷는 宣滯解鬱, 消散風熱하며, 甘草는 淸熱解毒하여 上消의 熱結로 因한 消渴에 應用될 수 있는 것이다^{22,23)}.

生津養血湯에 대한 최근의 실험적 연구로는 金 등¹⁴⁾이 生津養血湯이 Streptozotocin으로 유발된 고혈당 쥐의 혈중지질성분인 total lipid 및 triglyceride를 감소시킨다고 보고하였고, 金 등¹⁵⁾은 생진양혈탕이 streptozotocin의 투여로 증감되던 lipase, trypsin, amylase의 활성이 정상 수준으로 회복시킨다고 하여 그 유효성을 보고 하였다.

玫瑰花根이 糖尿治療에 쓰이는 것이 많이 알려진 이후로 이에 대한 研究도 施行되었는데, 손²¹⁾ 등은 해당화근을 투여하였을시에 혈당치 및 혈청 insulin 함량에 의하여 영향을 받는 간 glycogen 함량이 증가함을 보고하였으며, 천 등²⁰⁾은 해당화근이 당뇨유발 rat의 간과 췌장에서 과산화지질 생성에 미치는 영향을 보고한 바 있다.

본 연구 결과 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 생쥐의 대조군과 각각의 약물을 투여한 실험군의 혈청을 얻어 glucose와 혈액요소질소(BUN)를 측정하였다. 그 결과 혈당은 대조군(365.33 ± 91.01 , mg/dl)에 비하여 매괴화 추출액 투여군(169.43 ± 42.00 , mg/dl)과 생진양혈탕가미방 투여군(179.56 ± 73.36 , mg/dl)에서 현저히 감소하였다(Table 1, Figs. 10 & 11). BUN은 대조군(32.77 ± 2.16 , mg/dl)과 생진양혈탕가미방 추출액 투여군(32.31 ± 2.99 mg/dl)에서는 비슷하였지만 매괴화 추출액 투여군(25.15 ± 0.49 mg/dl)에서는 다소 낮게 나타났다.

千²⁰⁾에 의하면 STZ 50mg/kg를 흰쥐에 정맥주사 하였을 경우 對照群에서는 正常群에 비하여 構造的 排列에 異常(disarrangement)이 나타나고, 부분적으로 β -cell 이 壞死되며, 수가 감소되어 췌장섬의 세포사이 공간이 넓게 나타났다고 하였다. 그러나 해당화의

butanol fraction 100mg/kg 投與群에서는 β -cell의 壞死가 顯著히 감소되었으며, 200mg/kg에서는 用量依存性으로 組織病變이 회복되었다고 하였다.

Calbo 등²⁶⁾은 임신된 쥐에 streptozotocin을 투여하여 당뇨를 유발시킨 다음 태아 췌장의 β -cell을 관찰한 결과 세포질에 비하여 핵의 영역이 증가하였고 insulin을 투여하여도 치료가 되지 않았다고 하였다. 이와 같은 결과는 모체의 당뇨병이 태아의 β -cell을 과자극하며 증식을 활성화 하였기 때문으로 보았다. Mulder 등²⁷⁾은 췌장섬 amylin 결핍 생쥐 병태모델에 alloxan을 투여한 결과 β -cell의 수가 현저히 감소하였으며 β -cell의 기능장애가 나타났다고 하였다. 이와 같은 결과는 amylin의 결핍 원인은 alloxan에 의한 세포독성작용을 상승시키기 때문이라고 하였다. Reddy 등²⁸⁾은 streptozotocin으로 유발한 당뇨생쥐에서 유도된 nitric oxide가 큰포식세포로부터 분비됨으로써 β -cell의 파괴하는 중요한 매개 분자일 가능성이 있다고 하였다.

본 연구 결과 생쥐에 streptozotocin을 복강 투여하여 당뇨를 유발시킨 대조군의 췌장조직의 췌장섬에서는 insulin에 면역반응성 보이는 β -cells이 소수 관찰되었으나(Fig. 1), 매괴화 추출액을 투여한 실험군에서는 insulin에 강한 면역반응성을 나타내는 β -cells이 췌장섬 대부분에서 관찰되었다(Fig. 2). 생진양혈탕가미방 추출액을 투여한 실험군 췌장섬들은 매괴화 투여군에 비하여 보다 강한 insulin 면역반응을 보여주었다(Fig. 3). 이와 같은 결과로 보아 생진양혈탕가미방과 매괴화 추출액이 streptozotocin에 의하여 손상된 췌장섬의 회복에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

정상적인 생리상태에서 cyclooxygenase-1단백질이 발현되지만 상처가 있거나 병의 발현 및 임신과 같은 상황에서는 COX-2 단백질이 유도된다. 인슐린 의존성 당뇨병은 자가면역질환으로 인슐린을 분비하는 β -cells을 선택적으로 파괴하는 것이 특징이다. Cytokines은 인슐린 의존성 당뇨병이 발생하는 동안 염증과 β -cells 파괴에 관여하는 분자로 알려져 있다. 사람의 췌장에서 nitric oxide synthase와

cyclooxygenase-2의 발현에 대한 cytokine의 효과에 대해서 연구하였다. 그 결과 cytokines은 사람의 췌장에서 NOS와 COX-2의 발현을 유도한다고 하였다²⁹⁾.

Prostaglandins(PGs)는 지질분자로 염증과 면역반응을 포함한 세포공정에 깊게 영향을 준다. PG 생산에 관여하는 경로는 큰포식세포와 단핵구 같은 항원제공세포(antigen-presenting cells)에 의해 조절되어 활성화 되므로써 많은 양의 PG가 생산된다. 그래서 COX-2의 발현은 인슐린 의존성 당뇨병에 대한 표식자라고 하였다. 인슐린의존성 당뇨병환자의 불활성화된 단핵구에서 COX-2가 비정상적으로 발현되고 췌장섬이 자가항체를 갖게되면 질환의 위험성이 높아진다. 즉, COX-2의 출현은 당뇨병에 대한 높은 위험성을 말해주며, 자가항체-양성물 안에서 낮은 첫단계 반응으로 예언할 수 있다고 하였다³⁰⁾.

COX-1과 COX-2는 거의 모든 조직에 존재하지만 췌장섬은 COX-2만 존재하며 끊임없이 상당량 분비된다³¹⁾. T-림프구와 활성화된 큰포식세포에서 분비는 cytokines, 특히 interleukin-1은 면역학적 효과 분자로서 췌장섬의 β -cells에서 인슐린 분비를 억제하며 β -cells 파괴를 유발한다. Cytokines에 의해서 유도되는 isoform인 NO합성효소는 유리라디칼인 NO를 생성해서 β -cells의 기능을 억제하며, 또한 cytokines에 의해서 유도되는 isoform인 COX-2의 발현으로 proinflammatory prostaglandins과 thromboxanes를 과다생산을 하게된다³²⁾. 그러나 Zabel-Langhennig 등³³⁾은 PG 합성의 주효소로서 COX는 염증의 조절에 중요한 역할을 하는데 COX-1과 COX-2는 췌장의 섬세포에서 합성된다고 하였다.

Yip-Schneider 등³⁴⁾은 정상췌장조직과 비교하여 췌장암 조직에서 COX-2의 발현이 현저히 증가하는 것으로보아 COX-2는 췌장의 종양형성에 중요한 역할을 한다고 하였다.

면역조직화학적 방법을 통하여 사람 췌장암에서 COX-2의 분포와 존재를 조사한 결과 44%가 COX-2의 발현이 강하게 나타났으며, 46%가 중정도의 발현이 되고, 10%가 약하게 발현되었다³⁵⁾.

본 실험에서 생쥐에 streptozotocin을 복강 투여하여 당뇨를 유발시킨 췌장조직의 COX-2에 대한 면역반응성을 관찰한 결과, 대조군에서는 췌장섬과 췌장섬의 세포막에서 COX-2에 대한 면역반응성이 실험군에 비하여 높게 나타났으며, 특히 췌장조직의 소엽속관(intralobular duct)과 사이관(intercalated duct) 상피세포의 세포막들이 COX-2에 대한 보다 강한 면역반응성을 보여주었다(Fig. 4). 매피화 처리군(Fig. 5)과 생진양혈당가미방 처리군에서도 COX-2에 대한 면역반응성이 나타났으나 대조군에 비하여 미약하게 나타났다(Fig. 6).

췌장세포의 전자현미경적 관찰에서 streptozotocin으로 유발된 대조군 생쥐 췌장의 샘파리 손상은 미약하였으나, 중심샘파리세포에서는 파괴된 과립형질내세망과 소수의 사립체들이 흩어져 나타날 뿐 대부분의 세포질들이 손상되어 전자밀도가 아주 낮게 나타났다(Fig. 7).

그러나 매피화 추출액을 투여한 실험군(Fig. 8)과 생진양혈당가미방 추출액을 투여한 실험군(Fig. 9)에서 세포소기관의 손상은 거의 관찰되지 않았다.

이와 같은 결과로 보아 streptozotocin으로 유발된 생쥐의 당뇨병에 생진양혈당 가미방과 매피화근의 추출액이 효능이 있다고 사료되며, streptozotocin으로 췌장섬이 파괴되면 췌장의 샘파리세포에 세포염증을 가져온다고 사료된다. 당뇨병의 원인은 췌장섬에 존재하는 β -세포만의 기능이 아니라 샘파리세포의 기능과도 상관성을 갖는 것으로 사료되나 앞으로 이에 대한 연구는 더욱 진행되어야 한다고 본다.

결론

生津養血湯加味方과 玫瑰花 추출액 煎湯液의 투여가 streptozotocin(STZ)을 投與하여 高血糖을 유발시킨 생쥐에 미치는 영향을 규명하고자 면역조직화학적 검사, 전자현미경을 이용한 미세구조적 검사, 혈당 및 BUN의 변화를 측정된 결과를 아래와 같은 결론을 얻었다.

Insulin-면역조직화학적 검사 결과, 대조군의 췌장 섬에서는 insulin에 양성반응을 보이는 세포들이 소수 관찰되었으나, 실험군 모두에서 대조군에 비하여 높게 나타났으며, 특히 생진양혈당 가미방 투여군에서 가장 높은 양성반응을 보였다. COX2-면역조직화학적 검사 결과, 대조군의 썬파리세포들이 실험군에 비하여 높은 양성반응을 보였다. 전자현미경 관찰 결과, 썬파리세포들에서는 전자밀도가 낮은 물질을 함유한 소포들이 세포막 주변에서 다수 관찰되었으며, 중심썬파리세포들은 일부가 파괴되어 있었다. 그러나 매괴화 추출액 투여군과 생진양혈당 가미방 투여군에서는 세포 손상 소견이 없었다.

혈당은 대조군(365.33±91.01, mg/dl)에 비하여 매괴화 추출액 투여군(169.43±42.00,mg/dl)과 생진양혈당가미방 투여군(179.56±73.36, mg/dl)에서 현저히 감소하였는데, 매괴화 투여군이 가장 낮게 나타났다.

위와 같은 결과를 통하여 玫瑰花와 生津養血湯加味方 추출액의 투여가 STZ로 유발된 당뇨 생쥐의 치료에 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 민현기. 임상내분비학. 서울:고려의학. 1990:266-70.
2. 서울대학교의과대학. 내분비학. 서울:서울대학교출판부. 1991:243-53.
3. 김웅진 외. 당뇨병학. 서울:고려의학. 1992:391-468.
4. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과학, 서울:군자출판사. 1996:806-13.
5. 馬蒔, 志聰. 黃帝內經素問靈樞合編. 台北: 台聯國風出版社. 1977:<소문> 68, 280, 324-5, <영추> 201, 291.
6. 張仲景. 景岳全書. 서울:醫道韓國社. 1976:65, 383.
7. 孫思邈. 備急千金要方. 台北: 大星文化社. 1984:530.
8. 李樾. 醫學入門. 서울:翰成社. 1980:68, 71-3, 76-8, 149, 159-60, 314.
9. 황문동. 실용중의내과학, 상해:상해과학기술출판사, 1996:48.
10. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울:成輔社. 1989:138.
11. 沈金鰲. 沈氏尊生書. 北京:中國中醫藥出版社. 1997:276-82.
12. 吳克潛. 古今醫方集成. 上海:上海大衆書局. 1936:560.

13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1966:506.
14. 김신식, 최종원, 이경희, 이철완. 生津養血湯이 고혈당 쥐의 혈중지질성분에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 1995;16(2):337-47.
15. 김신식, 최종원, 이철완. 고혈당 쥐의 췌장 효소활성에 미치는 生津養血湯의 영향. 大韓韓醫學會誌. 1994;15(2):429-44.
16. 李尙仁 外. 韓藥臨床應用. 서울:成輔社. 1986:270.
17. 문관심. 약초의 성분과 이용. 서울:과학백과사전출판사. 1991:308-309.
18. 江蘇新醫學院. 新編中藥大辭典, 上海:신문풍출판사. 1994:1075-1079.
19. 박종철. 해당화 지하부의 성분에 관한 연구. 부산대학교 박사학위 논문. 1987.
20. 천세영. 해당화근의 Buthanol fraction이 Streptozotocin 유발 고혈당 Rat의 간과 췌장에서의 과산화지질생성에 미치는 영향. 중앙대학교 석사학위 논문. 1987.
21. 손낙원, 유진화. 해당화근이 Streptozotocin 당뇨 흰쥐의 간 Glycogen함량에 미치는 영향. 동의생리학회지. 1991;6(1):105-12.
22. 孟華燮. 方藥指鍼. 서울:남산당. 1976:231.
23. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院, 1975:59,102,104,107, 110,121,158,206,408,482-3,502,508.
24. 顧明君, 劉志民. Ligustrazine(川芎嗪)이 CyclosporinA(CsA)로 일으킨 흰쥐 Langerhans' islets β 세포독성에 미치는 방어보호작용의 실험 연구. 한글판 중서의결합. 1993;9:44-47.
25. 楊俊偉, 黎磊石. 실험성 당뇨병흰쥐 신장비대 및 고여과 작용에 대한 대황의 영향. 한글판 중서의결합. 1993;5:41-44.
26. Calbo RM, Forcen R, Obregon MJ, Escobar del Rey F, Moreale de Escobar G, Regadera J. Immunohistochemical and morphometric of the fetal pancreas in diabetic pregnant. Effects of insulin administration. Ana Rec. 1988;251(2):173-80.
27. Mulder H, Gebre-Medhin S, Betsholtz C, Sundler F, Ahren B. Islet amyloid polypeptide(amylin)-deficient mice develop a more severe form of alloxan-induced diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;278(4):E684-91.
28. Reddy S, Yip S, Karanam M, Poole CA, Ross JM. An immunohistochemical study of macrophage influx and the co-localization of inducible nitric oxide synthase in

- the pancreas of non-obese deabetic(NOS) mice during disease acceleration with cyclophosphamide. *Histochem J.* 1999;31(5):303-14.
29. Corbett JA, Kwon G, Marino MH, Rodi CP, Sullivan PM, Turk J, McDaniel ML. Tyrosine kinase inhibitors prevent cytokine-induced expression of iNOS and COX-2 by human islets. *Am J Physiol.* 1996;270(6 Pt 1):C1581-7.
30. Litherland SA, Xie XT, Huston AD, Wasserfall C, Whittaker DS, She JX, Hofig A, Dennis MA, Fuller K, Cook R, Schatz D, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Aberrant prostaglandin synthase 2 expression defines an antigen-presenting cell defect for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999;104(4):515-523.
31. Robertson RP. Dominance of cyclooxygenase-2 in the regulation of pancreatic islet prostaglandin synthesis. *Diabetes.* 1998;47(9):1379-83.
32. ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Bio Med.* 1996;211(1):24-32.
33. Zabel-Langhennig A, Holler B, Engeland K, Mossner J. Cyclooxygenase-2 transcription is stimulated and amylase secretion is inhibited in pancreatic acinar cells after induction of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 19:265(2):545-9.
34. Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis.* 2000;21(2):139-46.
35. Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2018-24.