

생지황(Rehmanniae Radix)과 배의 Phenolic Compound가 Streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향

김정상[†] · 나창수
동신대학교 한의과대학

Effect of Rehmanniae Radix and Pear Phenolic Compound on the STZ-Treated Mice for Induction of Diabetes

Jeong-Sang Kim[†] and Chang Soo Na

College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

Abstract

This study has been carried out to investigate effect of Rehmanniae Radix (RR) and pear phenolic compound (PC) on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin (STZ). For this purpose, male mice were fed with a 0.2 mL RR extract (S group) and the pear PC (90 mg/kg/day) dissolved in a 0.2 mL RR extract (SPC group) while the control group received the same commercial diet for 6 weeks. The blood glucose contents were examined from tail vein blood once a week for 6 weeks. Samples of pancreas removed after the experimental period were processed for the immunohistochemical identification of β -cells. The levels of serum glucose were decreased significantly ($p < 0.05$) in the S and SPC groups compared with the control group. The BUN and creatinine levels were significantly ($p < 0.05$) decreased in SPC group compared with the control group. Intraperitoneal glucose tolerance tests performed at 24 hours before that period revealed that glucose tolerances in S and SPC group were ameliorated. Immunohistochemical analyses of the pancreases revealed that a lot of insulin-positive β -cells were contained in a Langerhas's islets of S and SPC groups compared with the control group, and the number of Langerhas's islets were significantly increased in S ($p < 0.01$) and SPC ($p < 0.05$) groups. These results suggest that RR extract and pear PC could recover the damages induced by STZ in the hyperglycemic mice.

Key words: diabetes mellitus, Rehmanniae Radix, insulin-immunostain

서론

췌장은 소화효소를 생산하는 외분비조직과 호르몬을 분비하는 내분비조직으로 구성되어 있다. 내분비조직은 외분비조직 사이에 존재하는 상피세포 집단인 랭겔한스섬으로 보통 100만개 정도의 세포가 산재해 있다. 랭겔한스섬은 α -세포, β -세포, δ -세포 그리고 F-세포로 구성되어 있으며, 각각 glucagon, insulin, somatostatin 그리고 췌장 polypeptide를 생산한다. 인슐린을 생산하는 β -세포는 전반적으로 췌장섬의 중앙부위에 주로 존재하며 나머지 세포들이 주변부에 존재한다(1). 제1형 당뇨병은 췌장섬에 존재하는 대부분의 β -세포가 파괴되었을 때 발병되며(2), 제2형 당뇨병의 발생은 인슐린 내성과 함께 나타나며 췌장섬 β -세포의 부전과 연관성이 있다. 정상 β -세포는 인슐린 분비를 증가하여 인슐린 내성을 상쇄할 수 있지만 인슐린 내성이 충분하지 못하면 당불내성이 유도되어 고혈당이 나타나게 되고 β -세포의 기능은 점차 저하된다(3,4). 실험적으로 당뇨병 동물 모델을 만들

기 위해서는 췌장섬 중앙 치료제인 streptozotocin(STZ)을 과량 투여하면 정상 췌장조직 속에 존재하는 췌장섬 세포들이 파괴되어 고혈당이 유발되며(5), 당뇨병 발생과 함께 β -세포의 수와 인슐린합성이 감소된다(6,7). 만성적인 고혈당으로 β -세포의 기능이 손상되면 인슐린 합성과 분비에 이상을 초래할 수 있다(8,9).

당뇨병을 치료하기 위하여 인슐린을 구강 투여하면 간을 경유하기 때문에 간에서 포도당 생산을 억제하며(10), 인슐린과 같은 peptides나 단백질의 구강 투여는 흡수되기 이전에 효소들에 의해서 분해되기 때문에 안전성과 효능이 문제시 되고있다(11). 제1형 당뇨병 치료제를 투여하면 췌장섬 전구체 세포로부터 β -세포가 분화되거나(12), 췌장의 ductal stem cells가 내분비세포로 분화되어 췌장섬을 형성한다고 하였다(13).

본 연구자는 선행 연구에서 배에서 추출한 phenolic compound(PC)가 실험적 고혈당 생쥐에서 췌장섬의 재생이나 기능 회복에 관여한다고 보고한 바 있으며(14), 본 연구에서는

[†]Corresponding author. E-mail: jskim@dsu.ac.kr
Phone: 82-61-330-3412, Fax: 82-61-330-2900

清熱涼血과 養陰生津의 효능이 있어 한의학에서 소갈 즉 당뇨병의 치료에 사용되어 온 생지황과 배의 과피에서 추출한 PC가 STZ를 투여하여 유발시킨 고혈당 생쥐에 미치는 영향을 규명하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

당뇨유발

실험에 사용한 모든 생쥐(30±0.5 g)는 정상적인 사육환경에서 2주 이상 적응시킨 후 12시간 동안 절식시킨 다음 각각의 생쥐에 STZ 50 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 투여하여 1차 유발한 다음 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 복강 투여하여 고혈당 생쥐 모델을 구축하였다.

배의 phenolic compound와 생지황의 추출

배의 PC를 추출하기 위하여 70% acetone에서 배 과피의 추출액을 얻은 다음 농축하였다. 농축액을 hexane으로 세척하여 lipid와 chlorophyll을 제거한 다음 ethylacetate을 이용하여 용매 분획을 2차 진행하여 ethylacetate 획분을 얻은 다음 butanol 획분을 얻었다. 두 획분을 용매가 완전히 제거될 때까지 진공농축한 다음 농축된 건조물을 methanol에 녹여 다시 50°C에서 건조하여 사용하였다. 생지황 추출액은 생지황 27.3 g를 증류수 300 mL에 넣고 약탕기를 이용하여 3시간 끓인 다음 100 mL로 농축한 것을 사용하였다.

실험군 설정 및 약물 투여

대조군은 STZ를 투여하여 췌장섬(pancreatic islet) 손상을 유발한 다음 약물을 처치하지 않고 자연 치유과정을 거치게 하였다. 실험군은 고혈당 생쥐에 0.2 mL의 생지황 추출액을 사료에 혼합하여 섭취시킨 실험군(S군), 생지황 추출액 0.2 mL에 배의 PC(90 mg/kg)을 용해한 혼합물을 사료에 혼합하여 식이한 실험군(SPC군)으로 구분하였다.

체중 측정

매주 1회씩 6주 동안 실시하였으며, 12시간 동안 절식시킨 다음 체중을 측정하였다.

혈당측정

매주 1회씩 6주 실시하였으며, 측정 12시간 전에 금식을 시킨 다음 꼬리정맥혈을 취하여 Glucometer 4(Bayer Co.)로 측정하였다.

당내성검사

12시간 동안 절식시킨 다음 glucose(1.0 g/kg body weight)를 복강주사하였다. 그 이후 30, 60, 90, 120분에 각각 꼬리정맥을 통하여 혈액을 채취한 다음 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 혈당을 측정하였다.

Blood urea nitrogen(BUN) 측정

Elitech(France)에서 제조한 kit 시약을 사용하였으며, 시

약 I(tris buffer, pH7.60, 100 mmol/L; ADP 0.7 mmol/L; α -ketoglutarate 9 mmol/L; urease ≥ 6500 u/L; GIDH ≥ 1100) 1 mL에 혈청 0.01 mL을 넣고 혼합한 다음 1분 후에 시약 II(NADH 320 μ mol/L) 250 μ L을 혼합한 다음 Photometer 5010(Robert Riele GmbH & Co. KG, Germany)을 이용하여 340 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Creatinine 측정

Elitech(France)에서 제조한 kit 시약을 사용하였으며, 시약 1(picric acid, 8.73 mmol/L)과 시약 2(sodium hydroxide 300 mmol/L, disodium phosphate 25 mmol/L)를 동량으로 혼합한 working solution 1 mL에 혈청 0.1 mL을 혼합하여 Photometer 5010(Robert Riele GmbH & Co. KG, Germany)을 이용하여 492 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

면역조직화학적 검사

생쥐의 심장을 통하여 관류고정을 한 다음 췌장조직을 적출하여 4% paraformaldehyde에 24시간 동안 재고정하였다. 췌장조직은 paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 5 μ m 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 통상적인 방법으로 파라핀을 제거한 후 합수 과정을 거쳤다. 0.1 M phosphate buffer saline(PBS, 0.9% NaCl, pH 7.2) 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 인슐린 항체(Novocastra, UK)를 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 hematoxylin에 20초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

통계처리

모든 값들은 mean \pm standard error로 나타내었으며, 통계 처리는 SAS(statistical analysis system, version 6.12) program에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고 unpaired t-test를 시행하였으며, 유의수준은 0.05 이하인 경우로 하였다.

결과 및 고찰

체중의 변화

대조군의 체중은 당뇨 유발 직후부터 감소하였다가 2~3

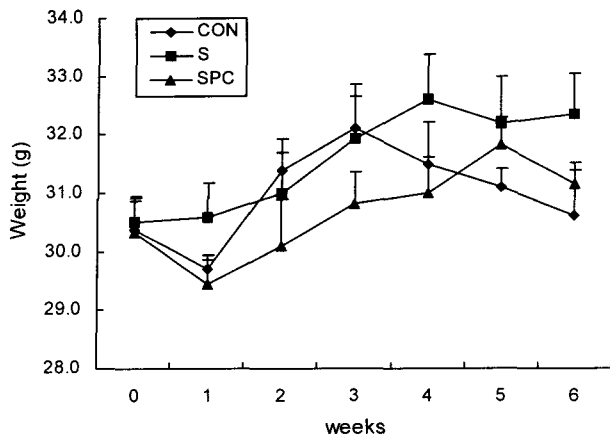


Fig. 1. The changes of body weight.
 Con, group of treated with STZ; S, a group fed 0.2 mL RR extract following treatment with STZ; SPC, a group fed pear PC (90 mg/kg/day) dissolved in a 0.2 mL RR extract following treatment with STZ. Values are mean ± SE; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

주에는 S군과 유사한 체중으로 증가하였지만 4주부터 급격히 감소하여 6주에서는 실험군에 비하여 낮았다. S군의 체중은 전반적으로 SPC군과 대조군에 비하여 높았다. SPC군은 1주에 급격히 감소하였다가 서서히 증가하였다(Fig. 1). 이와 같이 S군에서 STZ로 유발된 당뇨병 생쥐의 체중 증가를 가져온 결과는 생지황의 양음생진 효능(15)과 관련성이 있는 것으로 사료되며, 배의 SPC군에서 체중의 증가가 미약한 것은 배의 이노작용과 관련성이 있는 것으로 사료되나 기전에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

혈당량의 변화

대부분의 당뇨병은 자가면역질환이며, β-세포들이 심하게 손상된 후에 증상이 나타나지만(2), 실험적 당뇨병 동물모델을 구축하는 방법으로는 STZ 200 mg/kg을 한번 투여하여 바로 고혈당을 유발하는 방법(3)과 Like와 Rossini(5)가 제시한 것처럼 생쥐에 STZ 40 mg/kg을 5일간 연속 투여하여 인슐린염성 당뇨병 유발이 천천히 일어나도록 하는 방법이 있다. 본 연구자는 후자의 방법을 변형하여 5일간에 걸쳐 실험적 당뇨병을 유발하였으며, 혈당이 약 100~124 mg/dL인 생쥐를 본 실험에 사용하였다.

STZ로 랭겔한스섬의 β-세포가 파괴된 대조군의 혈당량은 4주부터 급격히 증가하여 6주에서는 가장 높은 혈당량(201 ± 18.11 mg/dL)을 보여주었는데 이와 같은 결과는 Like and Rossini(5)의 결과와 유사한 경향을 보여주었다. S군은 5주에서 가장 높은 혈당량(130.7 ± 13.88 mg/dL)을 보여주었을 뿐 실험기간 동안 대조군에 비하여 낮은 혈당량 수준을 유지하였는데 이와 같은 결과는 생지황의 주 효능인 청열양혈과 양음의 작용(15)으로 사료되었다. SPC군은 유발직후의 혈당량이 실험 기간 동안 지속되었으며, 4주 후부터는 대조군에 비하여 유의성(p < 0.01 or p < 0.05)있게 낮은 결과는 생지황과 배의 PC의 혼합투여가 STZ로 파괴된 생쥐의 β-세포

의 재생 또는 기능 회복에 작용하였음을 암시하였다(Fig. 2).

당내성 검사

Fig. 2에서 보여준 대조군과 실험군 6주의 생쥐를 대상으로 당내성 검사를 수행하였다. 대조군의 혈당량은 6주동안 점차 증가하였는데 당내성 검사 결과에서도 glucose 투여 후 높은 혈당을 유지하여 당내성이 실험군에 비하여 없음을 확인할 수 있었다. 대조군에 비하여 S군과 SPC군에서는 복강 투여한 glucose에 대한 내성이 양호한 것으로 나타났다(Fig. 3). 당뇨병 생쥐 실험군들의 glucose에 대한 내성이 좋아진 결과는 Fig. 1에서 제시한 바와 같이 생지황과 배의 PC를 투여한 실험군의 혈당농도가 대조군에 비하여 낮게 나타난 것과 관련성이 있다고 생각되며, 이와 같은 결과는 STZ에 의하여 파괴된 췌장섬 β-세포의 재생 또는 기능 회복과 관련이 있음을 암시하여 주었다.

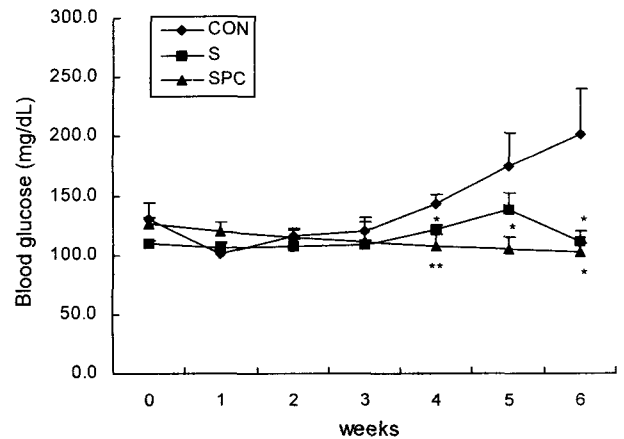


Fig. 2. Plasma blood glucose concentrations (mg/dL) measured one time a week from weeks 1 to 6.
 A streptozotocin was administered on day 0. See the legend of Fig. 1. ***Statistically different compared control with experimental groups (*p < 0.05, **p < 0.01).

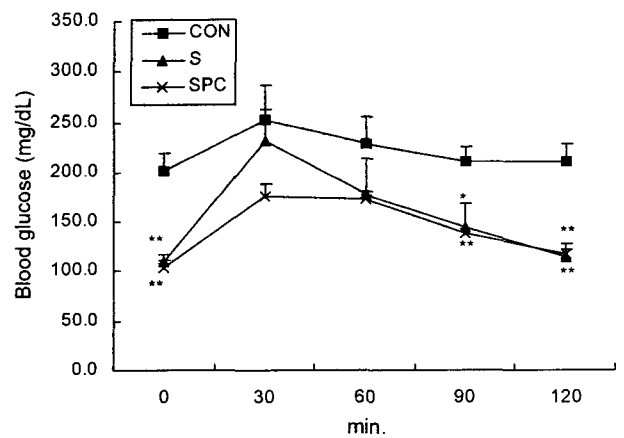


Fig. 3. The results of blood glucose (mg/dL) tolerance test.
 See the legend of Fig. 1. ***Statistically different compared control with experimental groups (*p < 0.05, **p < 0.01).

혈중 creatinine과 BUN의 농도 변화

인슐린 의존성 당뇨병은 고혈당이 장기간 유지됨으로써 당뇨병성 신증(diabetic nephropathy)를 유발하며(16,17), STZ로 유발된 당뇨병 생쥐도 신장질환이 동반되어 혈중 creatinine과 BUN의 농도가 증가한다(18). 본 실험에서 생쥐의 혈중 creatinine 농도를 약물을 투여한 6주후에 심장 채혈하여 측정된 결과 S군(0.54 ± 0.03 mg/dL)에서는 대조군(0.52 ± 0.03 mg/dL)에 비하여 약간 높게 나타났으나, SPC군(0.43 ± 0.02 mg/dL)에서는 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 낮았다(Fig. 4). BUN의 농도는 대조군(15.58 ± 0.84 mg/dL), S군(11.80 ± 0.73 mg/dL), SPC군(9.50 ± 0.90 mg/dL) 순으로 대조군이 가장 높게 나타났으며, S군과 SPC군은 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 낮았다(Fig. 5). 이와 같은 결과로 보아 생지황과 배의 PC가 당뇨병 생쥐에서 동반되는 신장질환의 예방 또는 기능 회복과 관련성이 있는 것으로 사료된다.

Insulin-면역조직화학 관찰 및 췌장섬의 계수

STZ를 투여하여 췌장의 췌장섬을 파괴한 대조군과 실험군 사이의 β -세포 활성을 비교하기 위하여 insulin-면역조직화학적 검색을 하였다. 6주 후 대조군(Figs. 6 & 7) 생쥐로부터 췌장 조직을 얻어 insulin-면역조직화학적 검색을 한 결과 췌장섬은 대부분 파괴되어 관찰하기 어려웠다. 소수 관찰되는 췌장섬도 대부분 파괴되어 있었으며 췌장섬 내에서 다수의 림프구들이 존재하였다. 그러나 소수의 β -세포에서 insulin-양성반응을 보여주었다. 이와 같은 결과는 고혈당이 개시된 직후 췌장섬 내에 림프구의 침윤이 현저하게 일어나며, 인슐린염은 당뇨병 발생보다 수일 선행되어 나타났다가 췌장섬의 β -세포가 손실되고 α , δ 와 PP세포들로 구성되어 주그러진 마지막 단계에서 없어진다(3,4,19)고 하였는데, 본 연구 결과에서도 STZ에 의해서 파괴된 대부분의 췌장섬에서는 침윤되어 있는 다수의 림프구들이 관찰되었다.

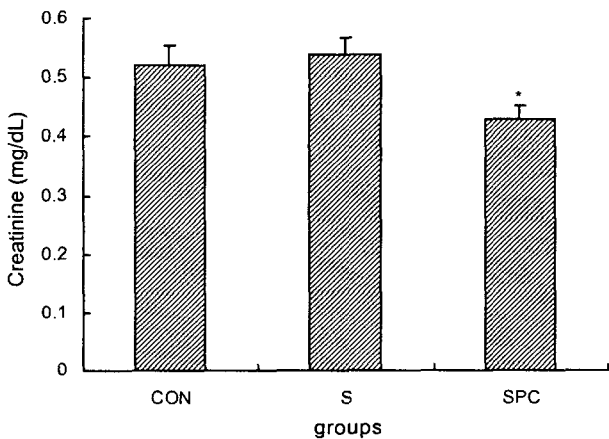


Fig. 4. Plasma creatinine concentrations (mg/dL) measured at 6 weeks.

See the legend of Fig. 1.

*Statistically different compared control with experimental groups ($p < 0.05$).

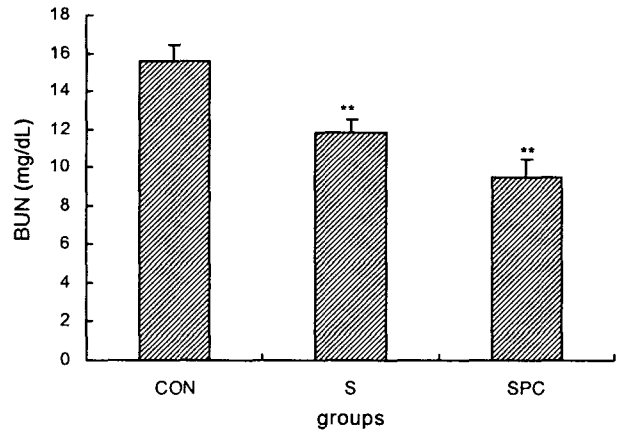


Fig. 5. Plasma BUN concentrations (mg/dL) measured at 6 weeks.

See the legend of Fig. 1.

**Statistically different compared control with experimental groups ($p < 0.01$).

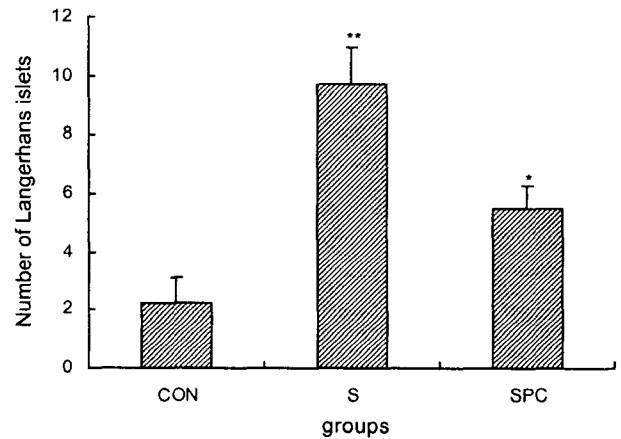
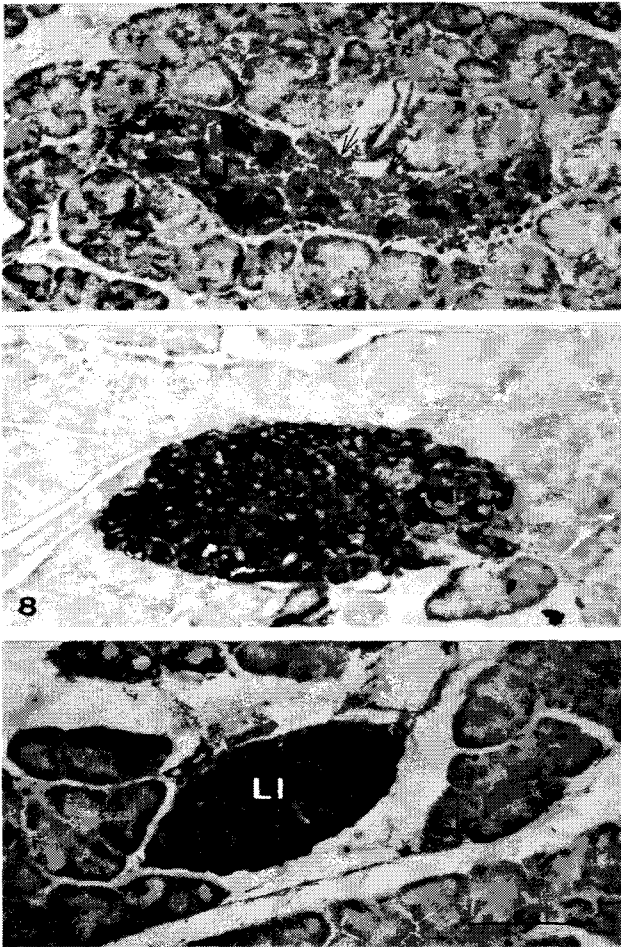


Fig. 6. The number of Langerhan's islet measured at 6 weeks.

See the legend of Fig. 1.

***Statistically different compared control with experimental groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

제1형 당뇨병의 치료제를 투여하면 췌장섬세포 전구체로부터 β -세포가 분화되며, 세포분열능력을 갖는 소수의 췌장섬세포들에 의해서 지속적으로 대체되거나(12,20), 관줄기세포가 내분비세포로 분화되어 하나의 췌장섬을 생성한다(13)고 하였다. 본 연구에서는 한의학에서 당뇨병 치료약제로 사용되는 생지황을 투여한 S군(Fig. 8)과 생지황에 배의 PC를 혼합하여 투여한 SPC군(Fig. 9)의 췌장에서 관찰되는 췌장섬은 대조군에 비하여 그 수가 유의성 있게 증가하였으며(Fig. 6), 췌장섬의 크기도 다양하게 나타나는 것으로 보아 STZ에 의해서 파괴되었던 췌장섬들이 STZ의 독성으로부터 회복되거나 재생되는 것으로 여겨졌다. 전반적으로 S군에서 췌장섬의 재생과 β -세포의 활성이 SPC군에 비하여 높게 나타났으나, 신장의 손상과 관련된 creatinine의 혈중 농도는 SPC군에서 낮게 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 췌장섬의 재생에 생지황이 보다 효과적인 것으로 보이며, 배의 PC가 당뇨병 신증으로부터 보호하는 효과가 있는 것으로 사료되



Figs. 7-9. Insulin-immunohistochemistry of pancreas from the 6 weeks mouse administered STZ.

A few of insulin-immunoreactive β -cells and lymphocytes (arrows) were observed in the Langerhans islet (LI) from control group (Fig. 7). A β -cells of Langerhans islet in the S (Fig. 8) and SPC group (Fig. 9) showed more abundant positive granules for insulin than control group. Magnification bar=25 μ m.

지만 이들의 기전에 대해서는 앞으로 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

선행연구에서 배의 과피에서 추출한 phenolic compound (PC)의 항당뇨 효능이 입증되었기에, 본 연구에서는 생지황 추출물과 배의 과피에서 추출한 PC가 streptozotocin(STZ)로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 0.2 mL의 생지황 추출물을 사료에 혼합하여 공급한 실험군(S군), 0.2 mL 생지황과 PC(90 mg/kg/day)를 혼합하여 공급한 실험군(SPC군) 및 사료만 공급한 대조군으로 구분하여 6주 동안 실시하였다. 체중 측정은 매주 1회, 혈당검사는 꼬리정맥 혈을 취하여 매주 1회씩, 당내성 검사는 실험이 완료되기 24시간 전에 각각 실시하였다. 6주 후 BUN과 creatinine을 검사하기 위하여 심장채혈을 하였으며, 관류고정 후 췌장을

을 적출하여 β -세포에 대한 insulin-면역조직화학적 검사를 실시하였다. 체중은 S군이 가장 높았으며, 대조군에 비하여 약 2 g 정도 많았다. 혈당은 S군과 SPC군에서 대조군에 비하여 유의성있게($p < 0.05$) 감소하였으며, BUN과 creatinine 농도는 SPC군에서 대조군에 비하여 유의성있게($p < 0.05$) 감소하였다. 당내성 검사결과 S군과 SPC군은 대조군에 비하여 개선된 결과를 보여주었다. 랭겔한스섬의 β -세포에 대한 insulin-면역조직화학적 검사 결과 insulin 양성 반응을 보이는 랭겔한스섬들의 수가 S군($p < 0.01$)과 SPC군($p < 0.05$)에서 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였으며, 면역반응성은 SPC군에서 가장 높게 나타났다. 이상의 결과로 보아 생지황의 추출물과 배의 과피에서 추출한 PC가 STZ로 유발된 고혈당 생쥐에서 항당뇨 효능이 있다고 사료되며, SPC군이 S군에 비하여 신장의 기능이 보다 양호하게 나타나는 것으로 보아 배의 과피에서 추출한 PC가 당뇨병신증으로부터 보호하는 작용이 있는 것으로 사료되거나 기전에 대해서 앞으로 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 “한국과학재단지정 동신대학교 산업용 가속이온 생물연구센터” 지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Daniel P Jr, Robert SS, Alian B. 2003. *Ellenberg & Rifkin's diabetes mellitus*. 6th ed. McGraw-Hill Co., New York. p 43.
2. Tisch R, McDevitt H. 1966. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-297.
3. Porte D Jr. 1991. β -cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 40: 166-180.
4. Vinik A, Pittenger G, Rafaeloff R, Rosenberg L, Duguid W. 1996. Determination of pancreatic islet cell mass: a balance between neogenesis and senescence/apoptosis. *Diabetes Rev* 4: 235-263.
5. Like AA, Rossini AA. 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-419.
6. Tokuyama Y, Sturis J, DePaoli AM, Takeda J, Stoffel M, Tang J, Sun X, Polonsky KS, Bell GI. 1995. Evolution of β -cells dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44: 1447-1457.
7. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS. 1998. Role of apoptosis in failure of β -cells mass compensation for insulin resistance and β -cells defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47: 358-364.
8. Robertson RP, Zhang H-J, Pyzdrowski KL, Walseth TF. 1992. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90: 320-325.
9. Sharma A, Olson LK, Robertson RP, Stein R. 1995. The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 β cells chronically exposed to high glucose concentration is asso-

- ciated with loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9: 1127-1134.
10. Lewis GF, Zinman B, Groenewoud Y, Vranic M, Giacca A. 1996. Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic effects of insulin in humans. *Diabetes* 45: 455-462.
 11. Roberts RL, Sandra A. 1992. Receptor-mediated endocytosis of insulin by culture endothelial cells. *Tissue Cell* 24: 603-611.
 12. Swenne I. 1983. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic β -cell of the rat. *Diabetes* 32: 14-19.
 13. Booner-Weir S. 2000. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302.
 14. Kim JS, Na CS. 2002. Effects of pear phenolic compound on the STZ-treated mice for induction of diabetes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1107-1111.
 15. 한국생약학교수협의회. 1994. 본초학, 초판. 아카데미서적, 서울. p 194.
 16. Munaka KR. 1995. Long-term complications of diabetes mellitus, part 1: retinopathy, nephropathy, neuropathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 25: 715-730.
 17. Nicholas R. 1997. Complication and concurrent disease association with diabetes mellitus. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 12: 263-267.
 18. Murali B, Goyal RK. 2001. Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin induced diabetic nephropathy. *Clin Exp Hypertens* 23: 513-520.
 19. Pickup JC, Williams G. 2003. *Chronic complications of diabetes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. p 313.
 20. Ramiya VK. 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6: 278-282.

(2003년 7월 24일 접수; 2003년 10월 28일 채택)