

# 강심탕이 Streptozotocin로 유발된 생쥐의 고혈당에 미치는 영향

김이곤\* · 이영수

동신대학교 한의과대학 내과학교실

## Effect of Gangsim-tang Extract on the Hyperglycemic Mice Induced with Streptozotocin

Yi Gon Kim\*, Young Su Lee

Department of Oriental Medicine, Graduate School, Dongshin University

This study has been carried out to understand the effect of Gangsim-tang on the hyperglycemic mice induced with Streptozotocin(STZ). The 60 mg/kg of streptozotocin(STZ) was treated into mice twice by 24 hrs interval and then 120 mg/kg STZ was treated again 3 days after the earlier treated. Control group was administered mice with 0.9% saline(2 ml/kg), and experimental groups were administered Gangsim-tang extract(GA group, 10 mg/kg/day; GB group, 30 mg/kg/day) after hyperglycemic induction daily for 6 weeks. The body weight of experimental groups was lower than control. The blood glucose concentration increased continuously, reaching to 298.9 mg/dl after 6 weeks, however, experimental groups of the GA and GB groups significantly(p<0.01) decreased in the 4, 5, and 6 weeks groups. Blood glucose tolerance test was not significant between control and experimental groups. We examined the blood transaminase activities to know the effect of herbal medicine on liver function. The glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT) activity was lower in group GB than in control. The glutamic-pyruvic transaminase(GPT) activity was lower in group GA and GB than in control. The superoxide dismutase(SOD) and catalase activities were higher in the group GA compared to control. The results of immunohistochemical study, Langerhan's islet of pancreas was destructed by treatment of STZ in the control, and a few of insulin positive cells observed in the control and experimental group. These results suggest that administration of Gangsim-tang extract to the hyperglycemic mice induced with STZ not regeneration of  $\beta$ -cells but control of the blood glucose level.

Key words : Streptozotocin(STZ), Hyperglycemic, Gangsim-tang(降心湯)

### 서 론

당뇨병(糖尿病; Diabetes Mellitus)은 인슐린의 분비부족이나 인슐린의 작용저하로 유발되는 고혈당 및 이에 수반되는 대사 장애가 장기간 지속되는 질환으로 췌장  $\beta$ -cell의 선택적인 파괴로 인한 절대적 인슐린 부족을 나타내는 인슐린 의존성 당뇨병(제1형)과 인슐린의 상대적 결핍 및 인슐린 저항성의 증가로 인한 인슐린 비의존성 당뇨병(제2형)으로 분류된다<sup>1-5)</sup>.

당뇨병의 병증은 동양의학에서 消渴, 皮膚癢痛, 燥, 痿, 眼昏,

風痺, 二陽病 등의 範疇로 思料된다<sup>6)</sup>. 역대 문헌에서는 당뇨 및 消渴에 관한 治方으로는 加味錢氏白朮散, 麥門冬飲子 등의 다양한 처방이 있으며 이중 降心湯을 上消의 處方으로 분류하였다<sup>7)</sup>. '降心湯'은 元代 危亦林的 《世醫得效方》<sup>8)</sup>에서 "降心湯 治心火上炎,腎水不濟,煩渴引飲,氣血日消..."라 언급된 이후 許浚의 《東醫寶鑑》<sup>9)</sup>에서도 위와 유사한 언급을 하였다. 降心湯은 天花粉을 君藥으로 人蔘, 當歸, 熟地黃, 白茯苓, 黃芪 등으로 주로 補陰, 補氣하는 藥물로 구성되어 있다<sup>9)</sup>.

한의학에서 당뇨관련 실험보고로는 枇杷葉<sup>10)</sup>, 白僵蠶<sup>11)</sup>의 투여가 glucokinase 및 hexokinase의 활성화에 미치는 효과와 珍糖元<sup>12)</sup>, 生地黃<sup>13)</sup>의 투여가 고혈당 조절작용 및 췌장에 미치는 영향에 대한 보고와 淸肺瀉肝湯<sup>14)</sup>, 竹瀝<sup>15)</sup>, 苦蔘<sup>16)</sup>, 蘆根<sup>17)</sup>, 五倍子<sup>18)</sup>, 生地

\* 교신저자 : 김이곤, 광주시 월산 2동 377-12 동신대학교 부속한방병원

· E-mail : yhh43@hanmail.net, · Tel : 062-463-1734

· 접수 : 2007/08/14 · 채택 : 2007/08/22

黃飮子加味<sup>19)</sup>가 실험적 당뇨에 미치는 영향 등이 있었으나 消渴의 치료효능이 언급된 降心湯에 대한 연구는 이루어 지지 않았다.

이에 저자는 STZ로 유발된 고혈당 생쥐에 消渴에 활용되는 降心湯을 투여량을 달리하여 설정한 실험군(GA군 : 10 mg/kg/day, GB군 ; 30 mg/kg/day)을 통해 체중변화와 혈당변화, 혈중 GOT·GPT활성의 변화, 간세포의 SOD·catalase 활성의 변화, 간세포의 전자현미경 관찰 등을 한 결과 약간의 知見을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

체중 32 g 내외의 ICR 系 웅성 생쥐(다물사이언스(주)로부터 구입)를 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 : 21±2℃, 습도 : 55±5%, 명암 : 12 hrs light/dark cycle)으로 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 降心湯의 조성 및 약물 추출

본 실험에 사용한 약재는 동신대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 降心湯의 구성은 《東醫寶鑑》<sup>7)</sup>에 준하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of Gangsim-tang

構成藥物	生藥名	用量(g)
天花粉	<i>Trichosanthis Radix</i>	8
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
黃芪(蜜炙)	<i>Astragali Radix</i>	4
五味子	<i>Schisandrae Fructus</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	2
總計		38

### 2. 방법

#### 1) 고혈당 유발

실험에 사용한 모든 생쥐는 정상적인 사육환경에서 1주 이상 적응시킨 후 12시간 동안 절식시킨 다음 각각의 생쥐에 STZ 60 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 복강 투여하여 1차 유발한 다음 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 복강 투여하여 고혈당 생쥐 모델을 구축하였다.

#### 2) 실험군 설정 및 약물 투여

대조군은 생쥐에 STZ를 투여하여 췌장섬의 손상을 유발한 다음 약물을 처치하지 않고 자연 경과과정을 거치게 하였다. 실험군은 降心湯 추출액 10 mg/kg/day을 구강 투여한 군(GA군)과, 30 mg/kg/day를 투여한 군(GB군)으로 나누었다.

#### 3) 체중 측정

대조군과 실험군의 체중은 12시간 동안 절식시킨 다음 측정하였으며, 매주 1회 6주 동안 동일하게 측정하였다.

#### 4) 혈당측정

혈당측정은 매주 1회 6주 동안 실시하였으며, 측정 12시간

전에 음식을 시킨 다음 꼬리정맥에서 혈액을 취하여 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 측정하였다.

#### 5) 당내성 검사

정상군은 당뇨를 유발시키지 않은 생쥐를 대상으로 실시하였으며, 실험군은 6주째의 대조군과 실험군을 대상으로 실시하였다. 당내성 검사를 시행하기 전에 12시간 동안 절식시킨 다음 glucose(1.0 g/kg body weight)를 복강주사 하였다. 그 이후 30, 60, 90, 120분에 각각 꼬리 정맥(caudal vein)을 통하여 혈액을 채취한 다음 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 혈당을 측정하였다.

#### 6) 인슐린 방사선면역활성측정법

생쥐에서 혈청을 분리한 후 Insulin 레벨을 rat insulin RIA kit를 사용하여 방사선면역활성측정법(Insulin radioimmunoassay : RIA)으로 측정하였다. Mouse insulin에 특이적인 guinea pigs에서 얻은 혈청과 125I -Insulin, Mouse 혈청을 반응시킨다. 반응 후 free 125I -Insulin를 분리한 후 방사선면역측정분석기  $\gamma$ -counter (COBRA 5010 series Quantum, USA)를 이용하여 radioactivity를 counting한다. Insulin 농도계산은 Secu RIA 프로그램 사용하여 농도를 산출하였다.

#### 7) Transaminase(S-GOT & S-GPT) 활성도 측정

실험동물을 심장 천자하여 채혈한 후 혈청을 분리한 다음 glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic-pyruvic transaminase(GPT) 효소활성도 측정용 kit 시약(Elitech, France)을 사용하여 340 nm에서 photometer(photometer 5010, Germany)로 측정하였다.

#### 8) 간 조직으로부터 SOD, catalase 추출 및 활성도 측정

대조군과 실험군 생쥐로부터 간 조직만을 신속히 분리하여 SOD를 추출하였다. 채취된 간 조직은 증류수로 3회 세척한 후 0.1 mM EDTA와 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 간 조직 시료의 4배 용량으로 첨가하여 세척한 다음 균질액을 얻기 위하여 homogenizer(Janke & Kunkel, Ultra-Turrax T25, Germany)를 이용하여 4℃에서 균질화 하였다. 이 균질액으로부터 핵 분해를 제거하기 위해 4℃에서 2,000×g로 5분 동안 원심 분리하였으며, 다시 4℃의 22,000×g에서 30분 동안 원심 분리하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획으로 분리하였다. 분리된 분획 중 상층액만을 조심스럽게 제거한 후 순수 분리를 위해 16,000×g에서 10분 동안 원심 분리하여 순수 CuZnSOD를 얻었으며, 이 초효소액을 단백질 분석에 이용하였다. 미토콘드리아에 분포하는 MnSOD를 얻기 위해 전 단계에서의 pellet에 50 mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA 용액 1 ml를 첨가하여 부유시킨 다음 4℃에서 22,000×g로 30분 동안 원심 분리하다 상층액만을 분리한 후 다시 80,000×g로 30분간 원심 분리하다 순수한 MnSOD를 얻었다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay를 이용하였으며, -70℃의 deep freezer에 보관하면서 실험에 이용하였다.

분리된 단백질에서 SOD의 활성도를 측정하기 위해 정량한 단백질 100  $\mu$ g/ $\mu$ l를 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 4℃의 저온 상태에서 30 mA로 전기영동하였다. gel은 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.8),  $1 \times 10^{-4}$  M EDTA,  $2.45 \times 10^{-3}$  M NBT를 포함한 용액에서 알루미늄 호일을 덮어 계

속 흔들어 주면서 20분 동안 염색하였다. 다시 gel은 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.8),  $1 \times 10^{-4}$  M EDTA, 0.028 M TEMED,  $2.8 \times 10^{-5}$  M riboflavin 용액에서 15분 동안 2차 염색한 후 15 W 형광램프 하에서 단백질 band를 확인하였으며, 그 결과는 densitometer (ImageMaster VDS, Pharmacia)를 이용하여 분석하였다.

Catalase 활성도 측정은 Beers and Sizer<sup>20)</sup>(1952)의 방법에 준하여 50 mM 인산칼슘 완충액(pH 7.2)에 기질인 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 효소 액을 가하여 최종 반응 액이 3.0 ml이 되게 한 다음 25°C에서 30초간 반응시키면서 240 nm 파장에서 소실되는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 양을 측정하였다. 효소 활성도의 단위는 15초간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를  $\mu\text{mol}$ 로 나타내었다.

9) 췌장의 면역조직화학 관찰

생쥐의 췌장 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5  $\mu\text{m}$  두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol 과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담가 흡수과정을 거치게 하였다. 12시간 후 pH 7.2, 0.1 M의 phosphate buffer saline(PBS, 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 조직 위에 insulin(Novo castra), insulin-like growth factor-II (IGF-II, H-103, Santa Cruz Biotechnology) 를 각각 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 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 20초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

10) 전자현미경 관찰

간조직의 일부를 절취하여 전고정액 속에서 1 mm 크기로 절단한 후 2.5% glutaraldehyde(phosphate buffer, pH 7.4)로 2시간 동안 전 고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ )로 2시간 후 고정 한 다음 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 세척 후 시료들은 상승농도 순의 에탄올로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후 Epon-Araldite 혼합액으로 포매하였고 60°C 오븐에서 30시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1  $\mu\text{m}$  두께로 절편을 제작하여 1% toluidine blue로 hot plate(60°C)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학현미경으로 관찰하여 조직을 확인한 다음 동일한 부위에서 60 nm 두께로 초박절편을 제작하여 silver grid에 부착하였고, uranyl acetate 와

lead citrate로 이중 염색한 다음 Hitachi H-7600 투과형 전자현미경(80 KV)으로 관찰하였다.

11) 통계처리

실험결과 대한 통계처리는 SAS(statistical analysis system) program에 의하여 각 실험군별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 체중 변화

약 30 g의 생쥐에 STZ를 투여하여 고혈당을 유발시킨 다음 치유과정을 거치지 않고 일반적인 식이 상태에서 대조군과 GA군은 유발 1주후 약 3 g 정도로 가장 급격히 감소하였으나, GB군은 약간(29.3±0.66 g) 감소하였다. 대조군과 GA군은 1주후 점차로 증가하여 6주 후에는 약 31 g의 체중을 보였으나 GB군(33.8±0.60 g)은 대조군과 GA군에 비하여 약 3 g 정도 높았으며 통계적으로 유의성을 보여 주었다(Table 2).

Table 2. The changes of body weight for 6 weeks.

weeks	Groups			
		CON	GA	GB
1	Mean±SE	26.6±0.62	27.9±0.83	29.3±0.66
	T-test		0.21	0.01
2	Mean±SE	28.2±0.92	29.1±0.88	30.6±0.84
	T-test		0.45	0.07
3	Mean±SE	29.0±0.55	29.9±0.99	31.8±0.68
	T-test		0.36	0.00
4	Mean±SE	30.4±0.63	30.4±1.03	32.6±0.77
	T-test		1.00	0.03
5	Mean±SE	30.9±0.69	30.9±0.88	32.8±0.67
	T-test		0.98	0.06
6	Mean±SE	31.3±0.69	31.8±0.92	33.8±0.60
	T-test		0.67	0.01

Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

2. 혈당량의 변화

STZ를 투여한 다음 생쥐의 혈당량이 약 150 mg/dl인 것을 대조군과 실험군으로 구분하였다. 대조군의 혈당량은 유발 후 점차 증가하다가 3주째에서 다소 감소하였으나 4주부터 급격히 증가하여 5주(293.9±30.21 mg/dl)와 6주(298.9±27.66 mg/dl)에서 높은 혈당량을 보여 주었다. GA군의 혈당량은 2주(169.9±17.46 mg/dl), 4주(174.4±25.75 mg/dl), 5주(192.0±16.12 mg/dl), 6주(151.3±17.02 mg/dl)군에서 대조군에 비하여 유의성있게 낮았으며, GB군에서는 4주(150.0±22.82 mg/dl), 5주(160.6±29.40 mg/dl), 6주(164.0±20.92 mg/dl)군에서 대조군에 비하여 유의성있게 낮았다(Table 3).

3. 당내성 검사

STZ를 투여하여 췌장의 Langerhan's islet를 파괴한 생쥐에 降心湯을 6주 동안 투여한 다음  $\beta$ -세포의 재생 또는 기능의 회복 정도를 밝히기 위하여 당내성 검사를 실시하였다. 포도당(1.0 g/kg body weight)을 생쥐에 복강주사 한 후 30, 60, 90, 그리고

120분에서 대조군, 그리고 실험군의 당내성 정도를 검사한 결과, 대조군에서는 투여 90분 후에 가장 높은 혈당치(430.0±74.23 mg/dl)를 보여주었으며, 120분 후에도 높은 혈당치(390.0±63.78 mg/dl)를 나타냈다. GB군에서는 투여 후 30분에서 가장 높은 혈당치(403.6±44.97 mg/dl)를 나타냈으나 전반적으로 대조군에 비하여 낮은 혈당치를 유지하였다. GA군은 대조군이나 GB군에 비하여 전반적으로 낮은 혈당치를 보여 주었으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4).

Table 3. The Changes of Blood Glucose Level

weeks	Groups			
	CON	GA	GB	
1	Mean±SE	171.4±6.80	149.3±13.99	154.4±13.84
	T-test		0.14	0.22
2	Mean±SE	255.5±26.33	169.9±17.46	190.3±19.07
	T-test		0.02	0.07
3	Mean±SE	178.3±23.15	142.8±18.70	152.9±21.20
	T-test		0.25	0.43
4	Mean±SE	251.0±25.02	174.4±25.75	150.0±22.82
	T-test		0.04	0.02
5	Mean±SE	293.9±30.21	192.0±16.12	160.6±29.40
	T-test		0.01	0.01
6	Mean±SE	298.9±27.66	151.3±17.02	164.0±20.92
	T-test		0.00	0.00

Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

Table 4. The Results of Blood Glucose Tolerance Test

min	Groups			
	CON	GA	GB	
0	Mean±SE	216.8±33.65	151.3±18.20	186.0±20.86
	T-test		0.09	0.44
30	Mean±SE	401.7±40.85	291.2±42.58	403.6±44.97
	T-test		0.10	0.97
60	Mean±SE	417.7±43.19	323.4±50.26	397.2±44.49
	T-test		0.20	0.74
90	Mean±SE	430.0±74.23	297.0±44.79	377.8±43.71
	T-test		0.10	0.47
120	Mean±SE	390.0±63.78	277.0±51.31	370.4±63.63
	T-test		0.17	0.83

Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

4. 혈중 insulin 농도의 변화

혈액 속의 인슐린 농도를 검색하기 위한 Insulin-방사선면역 활성법으로 측정된 결과 GA군과 GB군에서 측정되는 인슐린의 농도가 대조군에 비하여 미약하게 높게 나타났으나 정상군 생쥐에 비하여 매우 낮게 관찰되었다(Table 5).

Table 5. The changes of serum insulin level.

Groups	Insulin	
	Mean±SE	T-test
Nor	0.815±0.09	
CON	0.064±0.01	
GA	0.082±0.05	0.62
GB	0.076±0.02	0.59

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

5. 혈중 Transaminase(S-GOT & S-GPT) 활성의 변화

STZ를 투여하여 고혈당을 유발시킨 6주후에 대조군 생쥐의 혈중 GOT 농도를 측정된 결과(450.3±60.57 U/L)는 정상군에 비하여 높게 나타났으며, 실험군인 GA군(353.3±23.34 U/L) 과 GB군(345.1±18.90 U/L) 또한 정상군에 비하여 높게 나타났으나 대조군에 비하여 미약하게 낮았다(Table 5). 혈중 GPT의 농도 변화를 관찰한 결과 대조군(113.6±28.49 U/L)은 정상군(83.3±15.40 U/L)에 비하여 증가하였으나 실험군인 GA군(65.3±1.85 U/L)과 GB군(79.5±8.91 U/L)은 정상군과 유사한 농도를 보여주었다(Table 5).

Table 5. The changes of Transaminase Activities

Groups	GOT		GPT	
	Mean±SE	T-test	Mean±SE	T-test
Nor	128.7±3.49		83.3±15.40	
CON	450.3±60.57		113.6±28.49	
GA	353.3±23.34	0.21	65.3±1.85	0.15
GB	345.1±18.90	0.12	79.5±8.91	0.24

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

6. 간세포의 SOD, catalase 활성의 변화

세포손상을 가져오는 산소 유리기를 제거하는MnSOD의 활성은 대조군에서 가장 높게 나타났으며, 실험군인 GA군과 GB군에서도 대조군에 비하여 낮았지만 정상군에 비하여 높게 나타났다(Table 6, Fig. 1). CuZnSOD의 활성은 정상군(13,180±89)에 비하여 대조군(17,136±33)에서 증가하였으며, 실험군에서는 GA군(17,959±38)이 GB군(14,246±38)에 비하여 높게 나타났다(Table 6).

Table 6. The Changes of SOD Activities(Numerical Indicate Pixel Number)

Groups	MnSOD		CuZnSOD	
	Mean±SE	T-test	Mean±SE	T-test
Nor	6,056±20		13,180±89	
CON	10,005±65		17,136±33	
GA	8,818±87	0.25	17,959±38	0.80
GB	8,182±113	0.16	14,246±38	0.06

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01

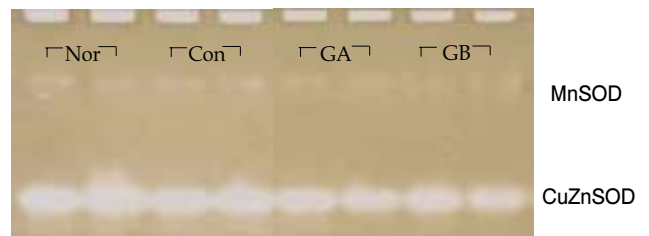


Fig. 1. SOD activity assayed in the liver of mouse on non-denaturing polyacrylamide gel. Each lane was loaded with 100µg of protein. Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean±SD, Standard deviation; Mn, MnSOD; CuZn, CuZnSOD.

catalase의 활성은 GA군(16.8414±1.85)이 가장 높게 나타났으며 GB군(10.3160±1.53), 대조군(11.3383±1.40), 정상군(8.5780±

6.07) 순 이었다(Table 7).

Table 7. The Changes of Catalase Activities( $\mu\text{mol. H}_2\text{O}_2$  reduced/mg protein/15sec)

Groups	Catalase	
	Mean $\pm$ SE	T-test
Nor	8.5780 $\pm$ 6.07	
CON	11.3383 $\pm$ 1.40	
GA	16.8414 $\pm$ 1.85	0.75
GB	10.3160 $\pm$ 1.53	0.59

Nor, normal group; Con, control group administered with STZ; GA, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day), GB, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day), Mean $\pm$ SD, Standard deviation; Prob> |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

8. 췌장의 insulin-면역조직화학

정상군 췌장조직에서 관찰되는 췌장섬(Langerhan's islet)의  $\beta$ -세포는 insulin에 강한 양성반응을 보여주었다(Fig. 2A). 대조군의 췌장섬은 정상군에서처럼 크게 관찰되었지만 insulin에 양성반응을 보이는  $\beta$ -세포들은 소수 관찰되었다(Fig. 2B). GA군 또한 대조군에서처럼 췌장섬의 크기는 크지만 insulin에 양성반응을 보이는  $\beta$ -세포들이 소수 관찰되었으나(Fig. 2C), GB군에서는 췌장섬의 크기는 작았지만 대부분의 세포들이 insulin에 양성반응을 보이는  $\beta$ -세포들이었다(Fig. 2D).

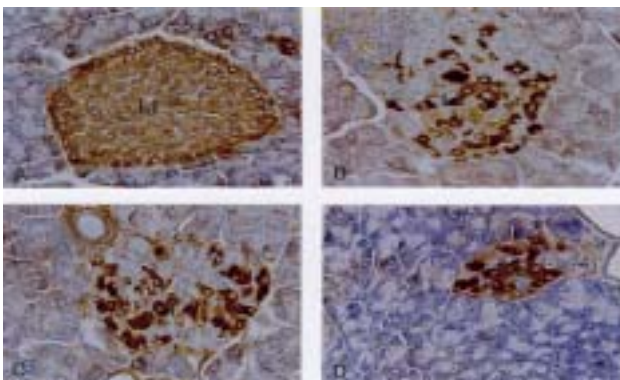


Fig. 2. Insulin-immunohistochemistry at 6 weeks. A, normal group; B, control group administered with STZ; C, feeding of Gangsim-tang(10 mg/kg/day); D, feeding of Gangsim-tang(30 mg/kg/day). LI, Langerhan's islet. Insulin-immunostain.  $\times 200$ .

8. 간세포의 전자현미경 관찰

대조군 간세포의 핵의 핵막은 둥글게 관찰되었으나, 핵질의 발달은 미약하여 전자밀도가 매우 낮게 관찰되었다. 세포질에서는 다수의 mitochondria가 둥글거나 난원형으로 관찰되었는데 매우 응축되어 있었다. 동모양혈관을 구성하는 내피세포의 형태가 뚜렷하지 않았으며, 혈관 내에서 많은 물질들이 관찰되었다. 전반적인 간세포의 소기관이 다소 손상되어 있는 소견을 보여주었다(Fig. 3A). GA군의 핵은 핵막이 다소 불규칙하게 관찰되었으나 핵질이 발달하였으며, 핵 속에서 커다란 핵소체(nucleolus)가 있었다. 세포질에서는 구형 또는 난원형의 미토콘드리아들이 다수 관찰되었는데 cristae의 형태는 대조군에 비하여 뚜렷하였다. 조면소포체의 아주 잘 발달되어 층판구조를 형성하고 있었다. 동모양 혈관을 구성하는 내피세포가 뚜렷하였으며, 혈관 내에서 적혈구가 관찰되었다. 세포질에서 당원과립들이 집적되어

있었다(Fig. 3B). GB군의 간세포는 핵의 핵막이 매우 불규칙하였지만 핵질과 핵소체는 발달해 있었다. 핵주변 세포질에서는 조면소포체들이 매우 발달하여 층판구조를 이루고 있었는데 내강은 다소 팽창되어 있었다. 세포질 전반에 걸쳐 관찰되는 미토콘드리아들은 다소 응축되어 있었으며 cristae는 관찰되지 않았다. 발달해 있었으며, 핵소체가 뚜렷이 관찰되었다. 세포질에서는 다수의 mitochondria들이 관찰되었다. 다수의 용해소체들이 세포질 곳곳에서 관찰되었다(Fig. 3C)

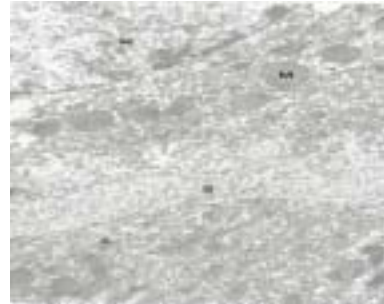


Fig. 3A, Electron micrograph of hepatocyte from the control group treated with STZ. M, mitochondria; N, nucleus; S, sinusoid,  $\times 12,000$

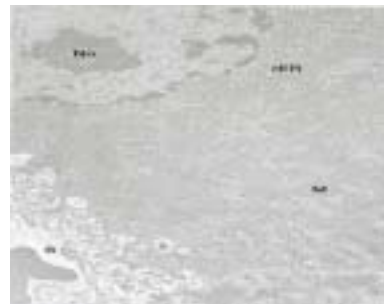


Fig. 3B. Electron micrograph of hepatocyte from the mouse administered Gangsim-tang(GA group, 10 mg/kg/day) for 6 weeks following treatment with STZ. M, mitochondria; No, nucleolus; S, sinusoid.  $\times 12,000$

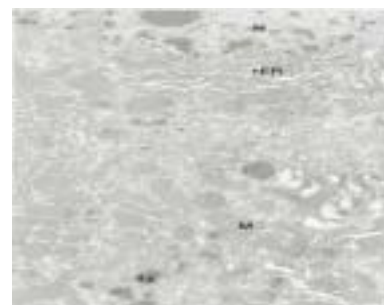


Fig. 3C. Electron micrograph of hepatocyte from the mouse administered Gangsim-tang(GB group, 30 mg/kg/day) for 6 weeks following treatment with STZ. Ly, lysosome; M, mitochondria; N, nucleus; rER, rough endoplasmic reticulum.  $\times 12,000$

고찰

당뇨병은 인슐린의 분비부족이나 인슐린의 작용저하로 유발되는 고혈당 및 이에 수반되는 대사 장애가 장기간 지속되는 질환으로 췌장  $\beta$ -세포의 선택적인 파괴로 인한 절대적 인슐린 부

죽을 나타내는 인슐린 의존성 당뇨병(제1형)과 인슐린의 상대적 결핍 및 인슐린 저항성으로 인한 인슐린 비의존성 당뇨병(제2형)으로 분류된다<sup>1-5)</sup>.

당뇨병은 한의학에서 消渴의 범주에 속하는데 陰盡虧損하여 燥熱內生하는 것이 기본 病機이다. 病因으로는 過飲이나 膏粱珍味の 섭취가 지나쳐 濕熱이 內生하거나, 憂鬱 등으로 脾胃에 積熱이 發하거나, 易怒, 嗜酒 등으로 肝火가 鬱結, 腎水의 耗傷으로 陰虛潮熱 등으로 因하여 유발된다. 消渴은 三消로 구분하는데 上消는 渴而多飲을 主證으로 胃熱로 인하여 肺陰이 耗損된 所致로 治法은 “清熱瀉火 生津止渴”이며, 中消는 消穀善飢가 主證으로 熱邪가 脾胃大腸을 薰蒸한 것으로 治法은 “清胃瀉火 養陰潤燥”, 下消는 小便頻數 如脂膏한 것이 主證으로 熱邪로 因하여 腎陰이 손상된 所致로 治法은 “清熱生津, 滋陰補腎”이다<sup>21)</sup>.

降心湯은 元代 危亦林的 《世醫得效方》<sup>8)</sup>에서 최초로 언급하였으며 이후 許浚의 《東醫寶鑑》<sup>7)</sup>에서 “治心火上炎, 腎水不濟, 煩渴引飲, 氣血日消.”라 언급하였다.

降心湯의 구성약물은 天花粉, 人蔘, 遠志, 當歸, 熟地黃, 白茯苓, 黃芪(蜜炙), 五味子, 甘草, 大棗로 구성되는데, 혈당강하에 미치는 영향으로 노 등<sup>22)</sup>이 천화분을, 변 등<sup>23)</sup>이 인삼을, 송 등<sup>24)</sup>이 숙지황 및 백복령이 포함된 육미지황탕을 보고하였다. 이를 종합하여 볼 때 降心湯은 清熱瀉火, 養血潤燥, 滋陰補血, 生津止渴, 利水滲濕하는 작용과 역대문헌에서 언급한 消渴의 병인병리와 치법과 부합하고 구성약물 또한 消渴에 대응되어 당뇨에 유의한 효과가 있을 것으로 기대되나 실험적인 연구가 미흡하여 본 연구를 시행하였다.

체중의 변화는 대조군과 GA군, GB군 모두 STZ로 인한 당뇨유발 1주후까지 체중의 감소를 보이다가 2주부터 점차 증가하는 경향을 나타내는데 특히 GB군은 3주차에, GA군은 4주차에 유발전의 체중을 나타내었다. 이는 STZ투여로 유발된 당뇨생쥐의 경우 체중이 점차 감소하나 인슐린 투여로 인해 정상치에 가깝게 회복된다는 보고<sup>25)</sup>와 비교하면 降心湯이 유의성 있는 체중 감소억제 효과를 나타낸다고 사료된다.

혈당량의 변화는 STZ를 생쥐에 투여하여 고혈당을 유발시킨 대조군에서는 점차 증가하다가 3주째 다소 감소하였으나 4주부터 급격히 증가하여 높은 혈당을 보였다. GA군의 혈당량은 2주와 4주째 이후부터, GB군은 4주째 이후부터 유의성 있게 감소하였다. 전반적으로 실험군의 혈당치가 대조군과 유의성 있게 차이가 날 뿐만 아니라 STZ 투여 직후의 혈당과 근사한 수치를 보여 降心湯이 탁월한 혈당강하의 작용이 있을 것으로 사료된다.

β-cell의 재생 또는 기능 회복정도를 밝히기 위하여 당내성 검사를 실시한 결과 저용량의 降心湯을 투여한 GA군이 보다 고용량을 투여한 GB군에 비하여 30분과 60분 90분 120분 후 등 모두에 걸쳐 혈당치가 낮게 나타났다. GB군은 30분의 당수치는 대조군과 비슷하였으며 이후 대조군에 비하여 미약하게 낮은 혈당치를 보여 주었다.

혈중 인슐린 농도의 변화를 관찰하고자 인슐린 방사선면역 측정법으로 측정된 결과 실험군은 대조군에 비하여 높은 인슐린 수치를 나타냈으나 정상군 생쥐에 비하여 매우 낮게 관찰

되어 降心湯이 β-cell의 재생 및 인슐린 생성과 연관성에는 큰 의의는 없는 것으로 보인다.

β-cell 활성을 비교하기 위하여 인슐린-면역조직화학적 검사를 한 결과 정상군의 췌장섬 β-cell 들은 인슐린에 강하 양성반응을 보여주었으나 6주 대조군의 췌장섬은 크기는 정상군과 비슷했으나 소수의 β-cell에서 인슐린-양성반응을 보여주었다. 이에 비해 실험군에서 GA군은 췌장섬은 대조군과 비슷하게 췌장섬은 크지만 인슐린-양성반응을 보이는 β-cell이 소수 관찰되었으나 GB군은 췌장섬 크기 자체는 정상군이나 대조군, GA군에 비해 작았지만 대부분의 세포들이 인슐린-양성반응을 보여주었다. 이와 같은 결과는 고농도 降心湯 투여(GB군)로 인하여 생쥐의 β-cell가 활성화되거나 재생되어 인슐린 분비 기능을 회복하였을 것으로 추측된다.

혈중 Transaminase는 정상적으로 소량이 혈중에 존재하지만, 간세포에 손상이 있는 경우에는 다량이 혈중으로 흘러들어가 혈중 농도가 증가하게 된다<sup>26)</sup>. 주로 간세포의 미토콘드리아에 주로 존재하는 GOT의 활성도 변화에서는 실험군이 각각 GA군(353.3 U/L), GB군(345.1 U/L)로 정상군(128.7 U/L)에 비하여 높게 나왔으나 대조군(450.3 U/L)과 비교하였을 때 상당히 낮은 수치를 보였다. 또한 간세포의 세포질에 주로 존재하는 GPT(27)의 활성도 변화에서는 실험군이 각각 GA군(65.3 U/L), GB군(79.5 U/L)로 대조군(113.6 U/L)에 비하여 상당히 낮았으며 정상군(83.3 U/L)과 유사한 농도를 보여주었다. 이와 같은 결과는 降心湯이 STZ로 인하여 간세포의 파괴로 인하여 상승되어 나타날 수 있는 효소인 GOT, GPT의 수치를 낮추어 주는 것으로 보아 간세포 및 간기능의 보호에 降心湯이 기여했음을 알 수 있다.

간세포에서 세포손상을 초래하는 활성산소의 변화를 살펴보고자 MnSOD와 CuSOD의 활성 및 간세포의 Catalase 활성 변화를 측정하였다. MnSOD와 CuSOD는 세포손상을 초래하는 산소유리기를 제거하게 하여 과산화수소 산물을 발생시키는 역할을 하며 Catalase는 SOD를 통하여 형성된 과산화수소 산물을 처리하는 역할을 한다<sup>28)</sup>. 실험결과 MnSOD와 CuSOD 모두 대조군에서 가장 높았으며 그 다음으로 실험군, 정상군 순으로 보아 대조군에서 가장 많은 세포 손상과 이에 따른 SOD의 활동정도가 가장 컸음을 알 수 있다. 실험군에서는 정상군에 비하여는 컸지만 대조군에 비하여 낮게 나타났다. Catalase 활성의 변화에서는 가장 많은 SOD활성을 보였던 대조군에 비해 GA군의 Catalase의 활성이 16.8414 μmol로 월등히 많았다. 이는 인체에 유해한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 제거에 降心湯을 투여한 실험군이 대조군에 비하여 탁월한 효과가 있음을 알 수 있다.

간세포의 일부를 절취, 고정하여 전자현미경으로 관찰한 결과 대조군 간세포의 핵의 핵막은 등글게 관찰되었으나, 핵질의 발달은 미약하여 전자밀도가 매우 낮게 관찰되었으나 실험군에서는 GA군·GB군 모두 다소 핵막은 불규칙하였으나 핵질이 발달해 있었으며 대조군에서 보이지 않던 핵소체가 보였다. 또한 대조군과 비교하여 실험군에서는 핵 주변 세포질에서 조면세포체들이 매우 발달하여 층판의 구조를 이루고 있었다. 전반적으로 대조군에서의 간세포 소기관이 다소 손상된 모습을 볼 수 있었

던 반면 실험군에서는 이에 비해 정상적인 각 기관의 모습을 사진을 통해 볼 수 있었다.

이상의 실험결과를 요약해 보면 실험군에서는 대조군에 비하여 체중 감소억제 및 혈당강하의 효과가 있었고 혈중인슐린 농도의 증가를 보였으며 췌장섬의 인슐린 면역조직화학에서 일부 실험군에서 강한 인슐린 양성반응을 보였다. 또한 혈중 GOT·GPT 효소측정을 통하여 간세포 및 간기능의 보호효과가 있었으며 체내에서 발생된 유해한 활성산소의 제거에 효과가 있었음을 알 수 있다. 간세포의 전자현미경적 관찰로 STZ로 손상된 간세포조직이 상당부분 회복되었는데 이로써 降心湯이 고혈당 생쥐의 혈당강하 효과와 고혈당으로 인한 간조직손상의 회복에 임상적으로 유의한 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

그러나 실험결과 중 혈당량의 변화에서 투여량을 달리한 GA군과 GB군 혈당수치의 큰 차이가 없었던 점, 혈중 인슐린 농도의 상승이 미약했던 점, 혈중 GPT수치가 GA군보다 GB군이 높았던 점, 간세포의 Catalase 활성에서 GB군이 GA군 보다 낮았던 점, 췌장섬의 인슐린-면역조직화학 관찰에서 약물의 투여 용량과 췌장섬의 크기 및 인슐린-양성반응을 보이는  $\beta$ -cell의 수가 일치하지 않는 점 등은 투여량과 실험결과 및 효과가 항상 비례하지는 않았다.

이상으로 降心湯의 고혈당 생쥐에 미치는 영향을 살펴본 바 혈당강하 및 체중감소 억제 효과는 유의성 있게 나타났으나 췌장  $\beta$ -cell 재생이나 혈중 인슐린 농도의 상승, 당내성 검사에서의 효과는 나타나지 않았다. 본 실험으로 미루어 보아 降心湯은 당뇨병환자의 혈당강하 효과는 기대할 수 있을지언정 당뇨병의 근본적인 치료제로서의 역할은 미흡하다고 볼 수 있다. 약물투여 기간 및 투여량, 투여 방법, 약물의 수치방법 및 가감 등을 감안한 다양한 실험이 행해지고 여타 변수를 고려한 보다 정밀한 측정과 검증이 이뤄져 당뇨병 치료에 효과적인 약물 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

ICR계 생쥐에 streptozotocin을 60 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 투여하여 1차 유발한 다음 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 복강 투여하여 고혈당을 유발한 생쥐에 消渴에 활용되는 降心湯이 미치는 효능을 규명하기 위하여 투여량을 달리 한 실험군 (GA군 ; 10 mg/kg/day, GB군 ; 30 mg/kg/day)을 통해 체중변화와 혈당변화, 당내성 검사, 인슐린 농도, 혈중 GOT·GPT수치, 간조직의 SOD, Catalase의 활성도 수치 그리고 간세포의 전자현미경관찰을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

체중변화 관찰 결과 실험군이 대조군에 비해 유의성 있는 체중감소 억제효과가 있었다. 유의성 있는 혈당강하효과는 있었으나 당내성 검사결과에서는 실험군이 대조군에 비해 유의성 있는 혈당강하 효과는 나타나지 않았다. 혈중 인슐린 농도의 수치 측정결과에서는 유의성 있는 수치변화를 관찰할 수 없었다. 혈중 Transaminase(GOT&GPT)활성의 변화관찰을 통하여 간세포 및 간기능 보호에 효과가 있었다. 간세포의 SOD 및 Catalase 활성

을 측정된 결과 세포손상을 일으키는 산소 유리기 제거에 효과가 있었다. 췌장섬의 Insulin-면역조직화학적 관찰결과 실험군이 대조군에 비하여 췌장섬  $\beta$ -cell의 Insulin 양성반응이 명확히 높게 나타나지는 않았다. 간장조직의 전자현미경관찰 결과 실험군이 대조군과 비교하여 핵의 핵질과 핵소체가 발달해 있으며 세포 소기관의 손상정도가 미약하였다.

이상의 결과로부터 降心湯이 혈당강하 효과와 고혈당으로 인하여 손상된 간장조직을 회복과 재생하는 것이 관찰되었으므로 효과적인 고혈당 조절에 응용될 수 있을 것으로 여겨지며 아울러 降心湯이 혈당강하 효과에 미치는 자세한 기전과 당뇨로 인한 간장조직의 회복과 재생에 미치는 기전에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 여겨진다.

## 참고문헌

1. 대한당뇨병학회. 당뇨병학. 서울, 고려의학, p 3, 1998.
2. 민헌기. 임상내분비학. 서울, 고려의학, pp 349-363, 1999.
3. 최영길 외. 내분비학. 서울, 의학출판사, p 695, 1994.
4. 의학교육연수원. 가정의학. 서울, 서울대학교 출판부, pp 330-332, 1999.
5. 김웅진 외. 당뇨병학. 서울, 고려의학, pp 1-2, 173-177, 1992.
6. 두호경. 동의신계내과학(下). 서울, 동양의학연구원, p 1173, 1993.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 법문문화사, pp 1329-1344, 2002.
8. 危亦林. 世醫得效方. 상해, 과학기술출판사, p 315, 1997.
9. 전국한의학대학교 본초학교수 共編著. 本草學. 서울, 영림사, p 165, 531, 578, 580, 302, 534, 622, 540, 542, 1995.
10. 尹哲浩, 申鉉喆, 鄭智天. IL-1 $\beta$  處理 糖尿病 마우스의 胰臟 glucokinase 및 hexokinase 活性에 對한 枇杷葉의 影響. 대한한방내과학회지 19(1):466-476, 1998.
11. 정병무, 현민경, 신원용, 김미량, 신현철, 윤철호, 정지천. STZ로 유발된 당뇨쥐에 대한 白僵蠶의 혈당 및 당대사 효소활성에 관한 효과. 대한한방내과학회지 25(2):288-297, 2004.
12. 김형준, 윤철호, 정지천. 진당원의 고혈당 조절 작용 및 기전에 관한 연구. 대한한방내과학회지 25(2):277-287, 2004.
13. 김정상. 생지황이 STZ로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 33(7):1133-1138, 2004.
14. 구진숙, 김장현. 청폐사간탕(淸肺瀉肝湯)이 Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 실험적 당뇨에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 11(1):244-245, 1997.
15. 장경선, 최찬헌, 정동주. 대나무 숲 제조과정에서 나오는 죽력이 Streptozotocin로 유발된 당뇨 생쥐에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 15(3):469-472, 2001.
16. 김진철, 김미려, 양재하, 최종백. 苦蔘이 당뇨에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 동서의학 16(3):47-67, 1991.
17. 김연섭. Streptozotocin 당뇨에 노근이 미치는 영향에 대한 면역조직화학적 연구. 동서의학 18(3):36, 1993.
18. 최형일, 정지천, 김철호. Cytokine interleukin-1 $\beta$ 로 유발된

- 당뇨병 마우스의 췌장 glucokinase 및 hexokinase 활성에 대한 오배자(五倍子)의 효능에 관한 연구. 한의학연구소논문집 7(1):65-74, 1998.
19. 최창원, 김희철. 生地黃飮子加味가 STZ으로 유발된 당뇨생쥐에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 26(1):12-47, 2005.
  20. Beers, R. F., I. W. Sizer. 1952. A spectrometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. pp 276-280, 1955.
  21. 두호경. 동의신계내과학(下). 서울, 동양의학연구원, pp 1131-1134, 1993.
  22. 노진구, 박정배, 이선동. 천화분(天花粉;Trichosanthes kirilowi)이 실험적 당뇨흰쥐의 췌장내분비세포에 미치는 영향에 관한 면역세포화학적 연구. 방제학회지 2(1):97-112, 1991.
  23. 변성희, 신민규, 김완희. 운동부하후 인삼이 혈중 포도당, 효소 및 근 Glycogen 변화에 미치는 실험적 연구. 대한동의생리학회지 4(1):97-110, 1989.
  24. 송태원, 이철완, 최종원. 熟地黃의 수치차이에 따른 六味地黃湯 전당액이 당뇨성 고지혈증에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 7(1):206-217, 1997.
  25. Rasch, R., Dorup, J. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. Diabetologia 40: 802-809, 1997.
  26. 서울대학교의과대학. 소화기학원론. 서울, 서울대학교출판부, p 492, 1998.
  27. 대한임상병리학회. 임상병리학. 서울, 고려의학, p 73, 87, 2001.
  28. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 서울, 의학문화사, pp 399-403, 2003.