

Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 당뇨병성 신증에서 加味枸杞還童丸이 Oxidative Stress 및 Polyol Pathway에 미치는 영향

정형철 · 정지천*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Gamigukihwandong-hwan* on Renal Function, Oxidative Stress and Polyol Pathway in Diabetic Nephropathy Rats

Hyung Cheol Jeong, Ji Cheon Jeong*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Diabetes is a disease in which the body does not produce or properly use insulin. Etiological studies of diabetes and its complications showed that oxidative stress might play a major role. Therefore, many efforts have been tried to regulate free oxygen radicals for treating diabetes and its complications. *Gamigukihwandong-hwan* has been known to be effective for the treatment of diabetes. The present study was carried out to investigate the effect of *Gamigukihwandong-hwan* on renal function, peroxynitrite (ONOO⁻) scavenging activity and polyol pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. The crushed *Gamigukihwandong-hwan* was extracted 3 times, each time with 3 volumes of methyl alcohol at 60°C for 24 h. The extract was filtered and evaporated under a reduced pressure using a rotary evaporator to yield 74.95 g. *Gamigukihwandong-hwan* extract was oral-administered 100 mg per 1 kg of body weight for 20 days to the diabetic rats induced by streptozotocin (60 mg/kg). The effects of *Gamigukihwandong-hwan* extract on the streptozotocin-induced diabetic rats were observed by measuring the serum level of glucose, insulin, lipid components, creatinine and BUN, and also the kidney levels of superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), nitric oxide (NO) and ONOO⁻, and also the enzyme activities involved in polyol pathway. The Effects of *Gamigukihwandong-hwan* on the streptozotocin-induced diabetic rats with regards to body weight, blood glucose and insulin levels, creatinine and BUN levels, total cholesterol and triglyceride levels, and HDL-cholesterol levels were all shown to be good enough to cure and prevent the diabetes and its complications. *Gamigukihwandong-hwan* inhibited the generation of $\cdot O_2^-$, NO and ONOO⁻ in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Renal aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activities were increased in the streptozotocin-induced diabetic rats, whereas the ones in the *Gamigukihwandong-hwan*-administered group among the streptozotocin-induced diabetic rats were reversed toward the natural activities. *Gamigukihwandong-hwan* might inhibit the development of diabetic nephropathy by scavenging reactive oxygen and nitrogen species, thereby by reducing oxidative stresses and also by regulating the activities of polyol pathway enzymes, all of which could help to recover the function of kidney.

Key words : *Gamigukihwandong-hwan*, diabetes, streptozotocin, renal function, oxidative stresses, peroxynitrite, polyol pathway

서 론

당뇨병과 만성 합병증의 발생에 활성산소를 비롯한 free radical들에 의한 oxidative stress가 관여한다고 알려져 있다^{1,2}. 고혈당이 만성적으로 지속되면 free radical의 생성이 증가되고 각종 방어 기전이 저하되는데, free radical은 반응성이 높아 혈관 내피세포에 손상을 주어 각종 혈관성 합병증이 발생한다³. 만성

* 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1 동국대 경주한방병원 2내과

· E-mail : jjcjh@paran.com, · Tel : 054-770-1265

· 접수 : 2007/04/04 · 채택 : 2007/06/07

합병증은 망막병증, 신병증, 신경병증 등의 미세혈관 합병증과 관상동맥질환, 뇌혈관 질환, 말초혈관질환 등의 대혈관 합병증이 있다⁴⁾. 특히, 신장 조직은 oxidative stress에 민감하여 손상을 입기 쉬워 만성 합병증 유발률이 다른 장기보다 높다¹⁾.

당뇨병성 신증은 당뇨병에 의한 가장 심각한 만성 합병증의 하나로서 인슐린 의존형 당뇨병 환자의 30-40%에서 말기 신부전으로 진행되어 혈액 투석이나 신장 이식술을 요하며, 중요한 사망 원인이 된다⁵⁾. 최근에는 새로 진단받은 말기 신부전증 환자의 41.5%가 당뇨병성 신증에서 기인하여 말기 신부전증의 가장 많은 원인 질환으로 보고되었다⁶⁾.

당뇨병성 신증의 병리 기전은 아직 확실하게 규명되어 있지 않으나, 지속적인 고혈당에 의해 생성되는 free radicals가 사구체 혈관 및 신세뇨관에 손상을 초래하는 것이 하나의 유발 요인으로 알려져 있다⁷⁾. 또한 nitric oxide (NO)도 매개 인자의 하나로 알려졌는데, 흰쥐의 사구체 메산지움세포에서 고포도당에 의하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 경로에 의한 NO의 합성이 의미있게 증가된다고 보고되었다⁸⁾. 병적인 조건 하에서 다양한 cytokine에 의하여 iNOS 경로가 활성화됨으로써 다량의 NO가 생성되어 신장 손상이 유발된다⁹⁾. 특히 NO와 superoxide anion radical ($\cdot O_2$)가 반응하여 생성되는 peroxynitrite (ONOO)는 지질, 단백질, DNA에 산화성 반응을 일으켜 세포 및 조직에 산화성 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

한편, oxidative stress 현상을 한층 가속화시키는 비정상적인 당 대사 과정으로 polyol pathway가 있는데, 인산화 과정 없이 포도당을 이용하는 경로로서 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase에 의해 반응이 이루어진다. 이 과정에 의해 세포 내에 fructose가 축적되어 각종 합병증이 진행된다^{4,11,12)}.

東洋醫學에서 당뇨병은 消渴의 범주에 속하는데, 陰津虧損으로 燥熱內生하는 것을 기본 病因으로 하며 清熱生津 止渴 滋陰 등의 治法이 활용되고 있다^{13,14)}. 消渴이 오래되거나 誤治하면 腦疽, 背瘡, 中滿, 鼓脹, 癰疽, 水病 및 失明 등의 消渴傳變證이 발생하는데 당뇨병의 만성 합병증과 유사하다¹⁵⁾. 실험연구에 의하면 珍糖元¹⁶⁾, 蟾蜍¹⁷⁾ 등이 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase 활성을 억제시키는 것으로 보고되었다.

加味枸杞還童丸은 普濟方¹⁸⁾에 수록된 枸杞還童丸에 黃精과 桑椹子를 加味하여 二精丸과 三精丸의 方意를 담고 있는 처방이다. 枸杞還童丸은 益肝腎之精, 明目進食, 益氣延年 등의 효능으로 肝腎俱冷 眼內昏花 飲食少進 등의 치료에 활용되어 왔고^{18,19)}, 二精丸은 助氣固精 補填丹田 活血駐顏 長生不老의 효능으로 肝腎陰虛 精氣虛少 頭暈目眩 早衰 消渴 등의 치료에 常用되고 있으며^{20,21)}, 三精丸은 滋補肝腎 健脾燥濕 延年益壽 面如童子 등의 효능으로 肝腎虧虛 精氣虛損 脾虛濕阻 등의 치료에 활용되고 있다^{19,20)}. 노년기에는 腎陰이 부족하여 消渴을 비롯한 성인병이 유발되기 쉽고 노화가 촉진되는데 加味枸杞還童丸의 陰氣를 補하는 효능은 노화 방지 효과와 함께 당뇨병 및 그 합병증의 억제에도 유효할 것으로 여겨진다.

이에 저자는 加味枸杞還童丸이 oxidative stress 및 polyol pathway를 조절하여 당뇨병성 신증에 효과를 나타내는지 검토하

고자 streptozotocin으로 당뇨병성 신증을 유도한 흰쥐에서 신기능과 혈청지질에 미치는 영향을 관찰하고 $\cdot O_2$, NO 및 ONOO의 생성에 미치는 영향과 polyol pathway에 관여하는 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

加味枸杞還童丸의 구성 약재는 시중 (태원당약업사, 대구, 한국)에서 구입하고 정선하여 사용하였으며, 1 貼 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition and contents of Gamigukihwandonghwan

한약명	생약명	중량
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	125 g
蒼朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	125 g
黃精	<i>Polygonati sibirici Rhizoma</i>	125 g
桑椹子	<i>Mori Fructus</i>	125 g
Total Amount		500 g

2) 동물

체중 250 g 내외의 건강함 Sprague-Dawley계 수컷 rat를 7일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 22℃ 내외, 습도는 50%로 유지하고 light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, rat용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

3) 시약 및 기기

Streptozotocin, sodium dodesyl sulfate (SDS), D-fructose, β-NAD, NADPH, NADP, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), bovine serum albumine 등은 Sigma chemical Co. (ST. Louis, MO, USA), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), ONOO, carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (A Brand of EMD Biosciences, Inc., USA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan), sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였으며, 기기는 GENios (GENios-basic, TECAN, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, SHIMADZU Co., Japan)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

加味枸杞還童丸 500 g을 잘게 분쇄하고 3배량의 95% methanol을 가하고 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 74.95 g (수율 14.99%)을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 당뇨병 유도 및 검액의 투여

실험동물을 정상군, 당뇨병을 유도한 대조군, 당뇨병 유도 후 加味枸杞還童丸을 투여한 실험군 등 3개의 군으로 나누었다.

대조군과 실험군은 citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 streptozotocin 용액 60 mg/kg을 1회 복강 주사하고 3일 후부터 glucose strip으로 당뇨병 발생을 확인하여 혈중 glucose가 300 mg/dl 이상인 실험동물만 각 군당 7마리씩 배정하였고 이때부터 실험군은 加味枸杞還童丸 추출물 100 mg/kg을 대조군은 동량의 증류수를 20일간 경구 투여하였다. 모든 실험동물은 생체시료 채취 전 16시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

3) 생체 시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 심장에서 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 glucose, insulin, cholesterol, triglyceride, creatinin, BUN 측정 효소원으로 사용하였다. 신장은 조직이 손상되지 않도록 천천히 간문맥에 생리 식염수를 관류시켜 혈액을 충분히 제거한 후, 신장을 채취하여 생리 식염수로 잘 씻어내고 Whatman 여과지로 식염수를 제거한 후 -70℃에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 신장 조직의 일부에 4배 용량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉 하에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 600 × g에서 10분간 원심분리하고, 8,000 × g에서 다시 20분간 원심분리하여 침전물인 mitochondria층을 분리하였으며 이를 제거한 상층액을 취하여 ·O₂, NO 및 ONOO⁻ 억제 활성, aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 0~4℃에서 실시하였다

4) Glucose 함량 측정

혈청중 glucose 함량은 Thomason 등의 방법²²⁾에 따라 조제된 시약 kit (아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37℃에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. glucose 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

5) Insulin 함량 측정

혈청중 insulin 함량은 anti-insulin이 coated된 96 well plate가 포함되어 있는 시약 kit (SHIBAYAGI, Co., Ltd.)를 사용하여 정량하였다. 96 well plate를 washing buffer로 씻어주고 biotin conjugated anti insulin과 혈청을 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 씻어주고 HRP conjugated streptavidin solution을 넣어 30분간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 씻어주고 substrate chromogen reagent를 넣고 30분간 반응시킨 후 reaction stopper를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 혈청 ml당 pg으로 나타내었다.

6) 혈청중 creatinine 함량

혈청중 creatinine 함량은 Jaffe법²³⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.5 ml에 정색시액 4.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 실온에서 20분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상청액 3.0 ml에 0.4 N NaOH 1 ml를 넣고 20분간 실온에 방치한 후 파장 520 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, creatinine 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 혈청 dl당 mg으로

나타내었다.

7) 혈청중 BUN 함량

혈청중 BUN 함량은 Urease-indophenol법²⁴⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소시액 2.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37℃에서 5분간 방치하고 정색시액 2.0 ml를 넣어 다시 37℃에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, BUN 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

8) 혈청중 total cholesterol 함량

혈청중 total cholesterol 함량은 효소법²⁵⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37℃에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고 total cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

9) 혈청중 triglyceride 함량

혈청중 triglyceride 함량은 효소법²⁶⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37℃에서 10분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, triglyceride 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

10) 혈청중 HDL cholesterol 함량

혈청중 HDL cholesterol 함량은 효소법²⁵⁾에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 혈청 0.02 ml에 분리 시액 0.02 ml를 넣고 잘 섞어준 후 실온에서 10분간 방치하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37℃에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, HDL cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

11) ·O₂, NO 및 ONOO⁻ 억제 활성 측정

Rat 신장의 postmitochondria 분획을 96 well microplate에 분주한 후 DCFDA를 처리하고 형광광도계 (여기파장 490 nm / 방출파장 520 nm)로 형광을 측정하여 활성산소 제거능을 검토하였다²⁷⁾. 또한 DAF-2를 처리한 후 NO 제거능을²⁸⁾, DHR 123을 처리하여 ONOO⁻ 제거능을²⁹⁾ 평가하였다

12) Aldose reductase 활성

Aldose reductase 활성은 Yamaoka 등의 방법³⁰⁾을 약간 변경하여 일정량의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 용액에 2 mM NADPH와 200 mM DL-glyceraldehyde 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 DL-glyceraldehyde를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

13) Sorbitol dehydrogenase 활성

Sorbitol dehydrogenase 활성은 Hollmann 등의 방법³¹⁾에 준하여 일정량의 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.6) 용액에 기질인 105 mM D-fructose, 0.2 mM NADH 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 D-fructose를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정

하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

14) 단백질 정량

단백질은 Lowry 등의 방법³²⁾을 사용하여 정량하였다.

15) 통계 처리

실험 성적은 평균치와 표준편차로 표시하고, 정상군과 대조군 및 대조군과 실험군 간의 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

성 적

1. 혈중 glucose, 인슐린 및 체중에 미치는 영향

혈중 glucose 함량은 정상군에 비하여 streptozotocin을 주입하여 당뇨병을 유발시킨 대조군에서 300 mg/dl를 넘게 현저하게 증가되었으나, streptozotocin을 주입하고 加味枸杞還童丸 추출물을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. 혈중 인슐린 농도는 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 감소되었으나, 실험군에서는 유의성 있게 증가되었다. 체중은 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 감소되었으나, 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다(Table 2).

Table 2. Effects of the Gamigukihwandonghwan(GKHD) extracts on the body weight, activity of serum glucose and insulin in streptozotocin-treated rat.

	Normal	STZ	STZ+GKHD
Glucose (mg/dl)	105.51 ± 12.12	356.78 ± 27.66 ^{a)***}	289.69 ± 22.38 ^{b)***}
Insulin (pg/ml)	408.25 ± 32.16	287.56 ± 29.87 ^{a)***}	327.46 ± 31.22 ^{b)***}
Body weight (g)	364 ± 15	213 ± 24 ^{a)***}	256 ± 22 ^{b)***}

Rats were injected streptozotocin (60 mg/kg) and administrated Gamigukihwandonghwan (100 mg/kg) for 20 days. Results are mean±S.D. (n=7). STZ : Streptozotocin, GKHD : Gamigukihwandonghwan. ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

2. 신기능에 미치는 영향

혈청 중 creatinine과 BUN 농도는 정상군에 비하여 대조군에서 현저하게 증가되었으나 실험군에서는 유의성 있게 저하되었다(Table 3).

Table 3. Effects of the Gamigukihwandonghwan(GKHD) extracts on the activity of serum creatinine and BUN in streptozotocin-treated rat.

	Normal	STZ	STZ+GKHD
Creatinine (mg/dl)	0.82 ± 0.06	2.63 ± 0.24 ^{a)***}	1.53 ± 0.14 ^{b)***}
BUN (mg/dl)	13.32 ± 0.93	56.34 ± 6.20 ^{a)***}	37.24 ± 4.10 ^{b)***}

Rats were injected streptozotocin (60 mg/kg) and administrated Gamigukihwandonghwan (100 mg/kg) for 20 days. Results are mean±S.D. (n=7). STZ : Streptozotocin, GKHD : Gamigukihwandonghwan. ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

3. 혈청 지질에 미치는 영향

혈청 중 total cholesterol 및 triglyceride 함량은 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 가되었으나 실험군에서는 유의성 있게 저하되었다. 혈청 중 HDL-cholesterol 함량은 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소되었으나 대조군에서 유의하게 증가되었다(Table 4).

Table 4. Effects of the Gamigukihwandonghwan (GKHD) extracts on the activity of serum triglyceride, total cholesterol and HDL cholesterol in streptozotocin-treated rat.

	Normal	STZ	STZ+GKHD
Total cholesterol (mg/dl)	147.59 ± 11.26	198.68 ± 21.03 ^{a)***}	177.98 ± 18.55 ^{b)***}
Triglyceride (mg/dl)	60.49 ± 5.12	118.59 ± 8.79 ^{a)***}	89.97 ± 7.28 ^{b)***}
HDL cholesterol (mg/dl)	39.89 ± 2.88	22.35 ± 3.15 ^{a)***}	29.88 ± 3.09 ^{b)***}

Rats were injected streptozotocin (60 mg/kg) and administrated Gamigukihwandonghwan (100 mg/kg) for 20 days. Results are mean±S.D. (n=7). STZ : Streptozotocin, GKHD : Gamigukihwandonghwan. ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

4. ·O₂ 생성에 미치는 영향

정상군의 ·O₂ 생성은 30.15±0.90%였으나 대조군에서는 42.16±2.77%로 증가되었으며, 실험군에서는 37.88±2.178%로 대조군에 비하여 유의성 있게 저하되었다(Fig. 1).

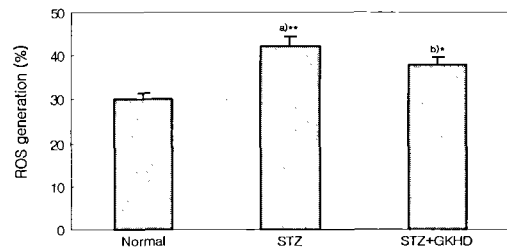


Fig. 1. Effect of Gamigukihwandonghwan (GKHD) on streptozotocin-induced reactive oxygen species generation in rat kidney. Rats were injected streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) and administrated Gamigukihwandonghwan (100 mg/kg) for 20 days. The generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.D. (n=7). ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

5. NO 생성에 미치는 영향

정상군의 NO 생성은 14.38±0.69%였으나 대조군에서는 21.65±0.97%으로 증가되었으며, 실험군에서는 19.35±0.77%로 대조군에 비하여 유의성은 없었으나 저하되었다(Fig. 2).

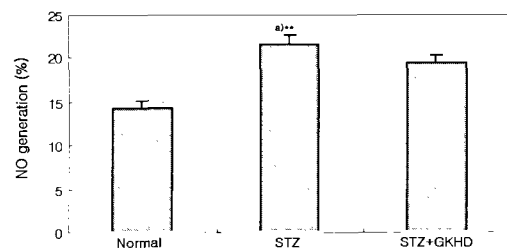


Fig. 2. Effect of Gamigukihwandonghwan (GKHD) on streptozotocin-induced NO generation in rat kidney. Rats were injected streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) and administrated Gamigukihwandonghwan (100 mg/kg) for 20 days. The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. Results are mean±S.D. (n=7). ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01).

6. ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

정상군의 ONOO⁻ 생성은 13.27±0.40%였으나 대조군에서는

24.32±1.21%로 증가되었으며, 실험군에서는 20.46±1.02%로 대조군에 비하여 유의성 있게 저하되었다(Fig. 3).

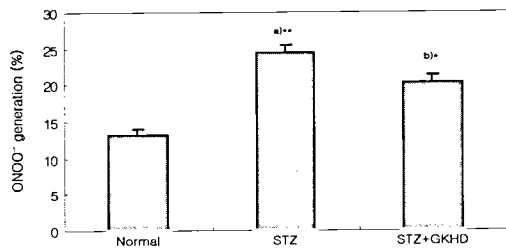


Fig. 3. Effect of *Gamigukihwandonghwan* (GKHD) on streptozotocin-induced ONOO⁻ generation in rat kidney. Rats were injected streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) and administrated *Gamigukihwandonghwan* (100 mg/kg) for 20 days. The generation of ONOO⁻ was measured by DHR123 fluorescence probe. Results are mean±S.D. (n=7). ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

7. Aldose reductase 활성에 미치는 영향

정상군의 aldose reductase 활성은 3.90±0.12 nmoles/mg protein이었으나 대조군에서는 5.09±0.25 nmoles/mg protein으로 증가되었으며, 실험군에서는 4.59±0.18 nmoles/mg protein으로 대조군에 비하여 유의성 있게 저하되었다(Fig. 4).

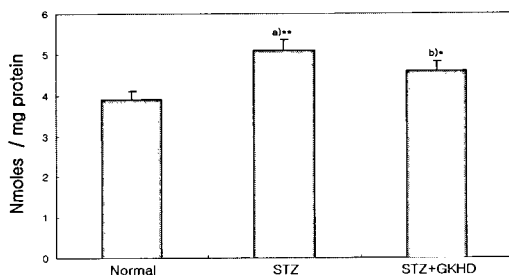


Fig. 4. Effect of *Gamigukihwandonghwan* (GKHD) on streptozotocin-induced aldose reductase level in rat kidney. Rats were injected streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) and administrated *Gamigukihwandonghwan* (100 mg/kg) for 20 days. Results are mean±S.D. (n=7). ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01).

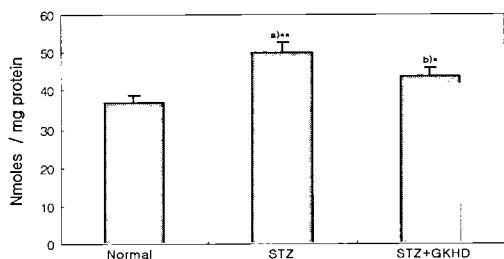


Fig. 5. Effect of *Gamigukihwandonghwan* (GKHD) on streptozotocin-induced sorbitol dehydrogenase level in rat kidney. Rats were injected streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) and administrated *Gamigukihwandonghwan* (100 mg/kg) for 20 days. Results are mean±S.D. (n=7). ^{a)} Significantly different from the normal. ^{b)} Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

8. Sorbitol dehydrogenase 활성에 미치는 영향

정상군의 Sorbitol dehydrogenase 활성은 38.21±1.15 nmoles/mg protein이었으나 대조군에서는 50.09±2.50 nmoles/mg protein으로 증가되었으며, 실험군에서는 43.22±1.57 nmoles/mg protein으로 유의성 있게 저하되었다(Fig. 5).

고찰

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 주된 원인 질환일 뿐 아니라 당뇨병에 의한 가장 심각한 장기 합병증 중 하나이다^{4,5)}. 만성적 고혈당의 결과로 신사구체 미세혈관에 탄수화물을 함유한 혈장 단백질이 침착하고 아울러 세포의 비대, 증식 및 기저막의 비후 등이 공통적으로 나타나는 미세혈관 합병증의 하나로 알려져 있다³³⁾.

당뇨병성 신증의 병리 기전은 아직 확실하게 규명되어 있지 않으나, 활성산소에 의한 peritubular microcirculation의 변화와 endothelial dysfunction 등이 중요한 원인 인자로 알려져 있다³⁴⁾. 활성산소는 glucose의 autooxidation에 의해서 생성되기도 하며 사구체 혈관 내피세포나 신세뇨관 세포 등에서 생성되어 신장 기능을 악화시키는 것으로 알려져 있다^{7,35)}. 또한 고포도당혈증에 의한 세포내 포도당 농도의 증가가 다양한 경로를 경유하여 각종 cytokine, 성장 인자, 혈관 조절 인자들의 변화를 유발하며, 이러한 변화의 복잡한 상호 작용에 의하여 궁극적으로 당뇨병성 신증이 유발되는 것으로 알려져 있다³⁶⁾.

한편, 고혈당 상태가 지속되면 비정상적인 당대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 한층 가속화시킨다. Polyol pathway는 정상에서는 활성화되어 있지 않으나 고혈당 상태에서 세포내로 유입된 많은 양의 포도당이 aldose reductase에 의해 sorbitol을 형성하고, 이후 sorbitol dehydrogenase에 의해 fructose (과당)로 전환되는 과정으로서 신경조직, 망막, 신장, 수정체 등에서 이루어진다. 세포 내에 과당이 축적되어 수분을 삼투압에 의해 끌어들이게 되는데, 이 과정에 의해 당뇨병의 합병증이 진행된다^{4,11,12)}.

한의학에서 당뇨병의 만성합병증은 소갈이 오래되거나 誤治하여 발생하는 消渴傳變證과 상당한 방면에서 유사한 점을 찾아 볼 수 있는데, 그 중에서 尿濁, 脹滿, 鼓脹, 水病, 腫脹, 虛乏 등이 당뇨병성 신증에서 나타나는 단백뇨와 부종, 피로 등의 증상과 유사한 범주에 속한다고 볼 수 있다¹⁵⁾. 당뇨병성 신증을 최근 中醫學에서는 黃³⁷⁾이 氣陰兩虛, 陰虛陽亢, 腎虛血瘀, 脾腎兩虛, 陽虛水泛, 腎虛關格 등으로 辨證하였고, 陳³⁸⁾은 氣陰兩虛燥熱, 脾腎陽虛 氣虛血瘀, 脾腎血瘀 瘀濁內蘊 등으로 辨證하여 肝腎陰虛와 脾腎陽虛를 비롯한 虛損이 위주가 되는 것을 알 수 있다.

본 실험에 사용된 加味枸杞還童丸은 枸杞還童丸을 비롯하여 二精丸과 三精丸의 方意를 담고 있는 처방이다. 枸杞還童丸은 益氣延年 효능이 있으며^{18,19)}, 二精丸은 活血駐顏 長生不老 효능으로 早衰의 치료에 상용되어 왔고^{20,21)}, 三精丸은 久服輕身 延年益壽 등의 효능이 있다^{19,20)}. 구성 약물의 효능을 살펴보면 枸杞子는 性味가 甘苦寒으로 滋腎養肝 補虛勞 強筋骨 明目聰耳 등의 효능을 가지고 있고, 蒼朮은 性味가 苦辛溫이며 燥胃健脾 發汗除濕

散風寒濕 能升發胃中陽氣 등의 효능을 가지고 있으며, 黃精은 性味甘平이며 補脾益氣 潤肺滋陰 填精髓 등의 효능이 있고, 桑椹子는 性味甘酸溫으로 補腎水 利五臟 安魂鎮神 聰耳明目 生津止渴 利水消腫 解酒烏髮 등의 효능을 가지고 있다^{39,40}. 특히 枸杞子와 黃精은 久服輕身不老의 효능이 있어 延年益壽 약물에 속하는데⁴¹, 消渴의 치료에도 사용되어 왔으며 동물 실험에서 혈당 강하 효과를 나타내었다^{14,42}. 한의학에서 腎과 脾의 虛損은 노화의 주된 원인으로 인식되고 있으므로⁴¹, 加味枸杞還童丸은 先天의 근본인 腎과 後天의 근본인 脾를 함께 보충하고 조절하여 노화 억제 효과와 함께 당뇨병성 신증에도 효과를 나타낼 것으로 기대하고 본 실험을 시도하였다. 본 실험에서는 췌장의 β -cell을 파괴시켜 insulin의 생성과 분비 기능이 억제되고 혈당이 상승되는 streptozotocin을 주입하여 당뇨병성 신증을 유도한 흰쥐에서 加味枸杞還童丸의 효과를 검토하였다.

Streptozotocin 주입에 의해 혈중 glucose 함량이 현저하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 유의하게 저하되는 것으로 나타났다. 또한 혈중 insulin 함량이 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 감소되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. Insulin의 정상적인 분비와 기능에 이상이 생기게 되면 혈중 유리되는 insulin 함량이 감소되어 당뇨병을 악화시키므로 加味枸杞還童丸추출물은 손상된 췌장의 β -cell에 작용하여 기능을 정상화시켜 억제된 insulin의 생성과 분비를 회복시켜주고 이로 인해서 당뇨병 조절 작용을 나타내는 것으로 생각된다.

체중 변화를 검토한 결과 streptozotocin에 의해 현저한 감소 현상이 관찰되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 유의하게 증가되었다. Streptozotocin에 의해서 당뇨병이 유발되면 에너지 원인 glucose의 체내 저장이 억제되고 이와 동반되어 체외로 소실이 증가되므로 저장 형태의 에너지를 많이 소모하게 된다. 이로 인해 체중의 급격한 감소가 나타나게 되는데 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 glucose의 소실을 억제시켜 이러한 효과가 상당히 억제되어짐을 알 수 있었다.

신기능에 미치는 영향을 검토한 실험에서 혈청 중 creatinine과 BUN 농도는 streptozotocin에 의해 현저하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 유의하게 저하되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 지속된 고혈당에 의한 신장 기능의 손상에 대하여 加味枸杞還童丸추출물이 회복 효과가 있다는 것을 의미한다.

당뇨병에서는 고중성지방혈증 (hypertriglyceridemia)이 자주 동반되며 HDL 콜레스테롤의 감소를 볼 수 있다. 본 실험에서 혈청 지질에 미치는 영향을 검토한 결과 streptozotocin에 의해 혈청 중 total cholesterol 및 triglyceride 함량이 유의하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물 투여로 유의성 있게 저하되었다. 또한 혈청 중 HDL-cholesterol 함량이 streptozotocin에 의해 유의하게 감소되었으나 加味枸杞還童丸추출물 투여로 유의하게 증가되었다.

당뇨병성 신증이 발생하는 주요 기전의 하나인 oxygen free radical의 생성에 미치는 영향을 검토한 실험에서 streptozotocin 처리에 의해 $\cdot O_2$ 생성이 현저하게 증가되었으나 加味枸杞還童

丸추출물의 투여로 인해 유의하게 감소되는 것으로 나타났다.

또한 세포질 내에서 L-arginine으로부터 생성되는 유리라디칼의 일종인 NO는 정상적인 경우에는 사구체의 혈액역동학적 조절 및 여과 작용에 관여하며 세뇨관에서의 Na 배설을 조절하는 생리적 역할을 담당하지만, 과량으로 생성된 NO는 주변 조직에 nitrosative stress를 주어 세포에 치명적인 손상을 준다. 그래서 NO는 당뇨병성 신증의 발생에 관여하는 매개 인자들 가운데 하나로 제시되고 있는데, NO와 $\cdot O_2$ 와 신속하게 반응하여 생성되는 ONOO⁻는 지질, 단백질, DNA에 산화성 반응을 일으켜 세포 및 조직에 산화성 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. ONOO⁻는 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에서 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타내므로 NO와 $\cdot O_2$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며⁴³, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 세포질 효소 활성의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다.

본 실험에서 NO와 ONOO⁻는 streptozotocin 처리에 의해 현저하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 인해 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 加味枸杞還童丸추출물이 $\cdot O_2$ 뿐만 아니라 NO와 ONOO⁻ 생성에 대하여도 억제 활성을 나타내어 당뇨병성 신증의 발생을 억제하는 것으로 사료된다.

Polyol pathway에 미치는 영향을 검토한 실험에서 streptozotocin 처리에 의해 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase 활성이 현저하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 인해 감소되는 것으로 나타났다. 이는 加味枸杞還童丸추출물이 두 효소의 활성을 억제하여 polyol pathway의 비정상적인 작동을 정상적으로 조절해 주므로서 oxidative stress로 인한 조직 손상을 억제시켜 당뇨병 합병증의 발현을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험의 결과를 종합해 보면 加味枸杞還童丸이 $\cdot O_2$, NO 및 ONOO⁻ 생성을 억제하고 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 조절함으로써 oxidative stress를 감소시켜 당뇨병 및 당뇨병성 신증의 발생을 억제하는 것으로 생각된다.

결론

加味枸杞還童丸이 당뇨병성 신증의 예방과 치료에 효과를 나타내는 지를 구명하기 위하여 streptozotocin으로 당뇨병을 유도한 흰쥐를 대상으로 신기능과 혈청지질에 미치는 영향을 관찰하고 polyol pathway에 관여하는 효소의 활성과 활성산소, 활성질소에 미치는 영향을 검토하였다.

Streptozotocin 주입에 의해 혈중 glucose 함량의 증가, 혈중 insulin 함량의 감소 및 체중의 감소가 현저하였으나 加味枸杞還童丸추출물 투여한 경우에 유의성 있게 회복되었다. 혈청 중 creatinine과 BUN 농도는 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물 투여에 의해 유의성 있게 저하되었다. streptozotocin 주입에 의해 혈청 중 total cholesterol 및 triglyceride 함량이 유의하게 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물 투여에 의해 유의성 있게 저하되었다. 혈청 중

HDL-cholesterol 함량은 streptozotocin 주입에 의해 유의하게 감소되었으나 加味枸杞還童丸추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다. Streptozotocin 주입에 의해 $\cdot O_2$, NO 및 ONOO⁻ 생성이 증가되었으나 加味枸杞還童丸 투여에 의해 저하되었다. aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성은 streptozotocin 주입에 의해 증가되었으나 加味枸杞還童丸추출물의 투여로 억제되었다.

이러한 실험 결과는 加味枸杞還童丸이 신기능을 회복시키고 $\cdot O_2$, NO 및 ONOO⁻의 생성을 억제하여 oxidative stress를 감소시키며 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 조절함으로써 당뇨병성 신증을 비롯한 합병증 발생을 억제하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Baynes, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 40: 405-412, 1991.
2. Maureen, I.H. and Michaela, M. Screening for NIDDM. *Diabetes Care*. 17: 440-444, 1994.
3. Hammers, H.D., Martin, S., Fedesrlin, K., Geisen, K. and Brownlee, M. Aminoguanidine treatment inhibit the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 11555-11558, 1991.
4. 김응진 외. 당뇨병학. 서울, 고려의학, pp 15-43, 32-33, 149-169, 391-468, 475-487, 609-616, 1998.
5. Viberti, G.C., Walker, J.D. Diabetic nephropathy : etiology and prevention. *Diabetes/Metab Rev*. 4: 147-159, 1988.
6. 대한신장학회 등록위원회. 우리나라 신대체요법의 현황. *대한신장학회지* 21(suppl 2):S189-203, 2002.
7. Yagoob, M., McClelland, P., Patrick, A.W., Stevenson, A., Mason, H., White, M.C., Bell, G.M. Evidence of oxidant injury and tubular damage in early diabetic nephropathy. *Q. J. Med*. 87: 601-607, 1994.
8. Noh, H., Ha, H., Yu, M.R., Kang, S.W., Choi, K.H., Han, D.S., Lee, H.Y. High glucose increase inducible NO production in cultured rat mesangial cells. *Nephron*. 90: 78-85, 2002.
9. Bennai, F., Morsing, P., Paliege, A., Ketteler, M., Mayer, B., Tapp, R., Bachmann, S. Normalizing the expression of nitric oxide synthase by low dose AT1 receptor antagonism parallels improved vascular morphology in hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol*. 10(Suppl 77):S104-115, 1999.
10. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 1620-1624, 1990.
11. Pugliese, G., Tilton, G.T. and Williamson, J.R. Glucose-induced metabolic imbalance in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev*. 7: 35-59, 1991.
12. Stevens, M.J., Dananberg, J., Feldman, E.L., Lattimer, S.A., Kamijo, M., Thomas, T.P., Shindo, H., Sima, A.A. and Greene, D.A. The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and Na-K-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. *J Clin Invest*. 94: 853-859, 1994.
13. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, p 477, 1986.
14. 余永譜. 中醫治療內分泌代謝疾病. 浙江, 浙江科學技術出版社, p 239, 243, 1992.
15. 강석봉. 消渴의 傳變證과 당뇨병의 만성합병증에 대한 비교 고찰. *대한한의학회지* 19(2):137-152, 1998.
16. 김형준, 윤철호, 정지천. 珍糖元의 고혈당 조절 작용 및 기전에 관한 연구. *대한한방내과학회지* 25(2):277-287, 2004.
17. 이철웅, 정지천, 신현철. 고혈당 흰쥐에서 鱗螬의 혈당 조절과 항산화작용에 관한 연구. *대한한의학회지* 27(1):91-103, 2006.
18. 朱 楠. 普濟方. 서울, 翰成社, p 3339, 1995.
19. 何紹奇, 宋乃光 編著. 中老年保健養生方. 北京, 學苑出版社, pp 208-209, 219-220, 2002.
20. 王毅, 靳長金 朱君波 編著. 益壽效方 120. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 31-32, 95, 1989.
21. 盧祥之 編著. 益壽延年二百方. 北京, 中國中醫藥出版社, p 150, 1991.
22. Thomson, R.H. Colorimetric glucose oxidase method for blood glucose. *Clin Chem Acta*. 13: 133-135, 1966.
23. Miller, B.F. and Dubos, R. Studies on the presence of creatinine in human blood. *J. Bio. Chem.*, 121: 447, 1937.
24. Tietz, N.W. *Fundamentals of clinical chemistry*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, pp 991-998, 1976.
25. Levinson, S.S. Use of an enzymatic method for cholesterol, designed for continuous flow instrumentation, with discrete bichromatic and centrifugation analysis. *Clin. Chem*. 23: 2335-2337, 1977.
26. Flether, M.J. A colorimetric method for estimation serum triglyceride. *Clin. Chem*. 22: 393, 1968.
27. Cathcart, R., Schwieters, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem*. 134: 111-116, 1983.
28. Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem Tokyo*. 125: 658-661, 1999.
29. Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 16: 149-156, 1994.
30. Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J. and Kokai, Y. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human

- aldose reductase cDNA. *Diabetologia*. 38: 255-261, 1995.
31. Hollmann, S. In Hoppe-Seyler Thiefelder : Handbuch der physiol. und path.-chem. Vol. VIa. Berlin-Heidelberg-New York, Analyse Springer. p 704, 1964.
32. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275, 1951.
33. Viberti, G.C., Wiseman, M.J. The kidney in diabetes : Significance of the early abnormalities. *Clin Endocrinol Metab*. 15: 753-760, 1986.
34. Wardle, E.n. Cell biology and the function changes of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 7: 889-895, 1992.
35. Paller, M.S., Neumann, T.V. Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kidney Int*. 40: 1041-1049, 1991.
36. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 329: 977-986, 1993.
37. 黃春林 外. 心腎疾病臨證證治. 廣東, 廣東人民出版社, p 316, 2000.
38. 陳以平. 腎病的辨證與辨病治療. 北京, 人民衛生出版社, pp 143-161, 2003.
39. 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 71, 74, 118-119, 207, 1981.
40. 吳儀洛. 本草從新. 上海, 上海科學技術出版社, pp 22-23, 67, 180, 1982.
41. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧, 遼寧科學技術出版社, pp 53-54, 327-329, 331-334, 1989.
42. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京, 人民衛生出版社, pp 741-743, 998-1000, 1983.