

원저

## 桂枝藥鍼이 Streptozotocin 유도 당뇨 흰쥐의 췌장세포 손상에 미치는 보호 효과

서창완 · 이상훈 · 박동석 · 강성길

경희대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### Protective Effects of *Cinnamomi Ramulus* Herbal Acupuncture on $\beta$ -cell Damage of Streptozotocin-induced Diabetic Rat

Seo Chang-wan, Lee Sang-hoon, Park Dong-suk and Kang Sung-keel

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

**Objectives** : For evaluation of preventive and anti-diabetic activities of *Cinnamomi ramulus*(CR) herbal acupuncture on pancreatic islet damage in streptozotocin(STZ)-induced diabetic rat.

**Methods** : CR herbal acupuncture was performed at *Bisu*(BL<sub>20</sub>) for 3 weeks subcutaneously starting 1 week before STZ i.p. injection. SD rats were divided into four groups(n=10 for each group); 1) NC group, non-treated normal control group, 2) STZ group, STZ administered control group, 3) CR125 group, CR(125mg/kg) + STZ administered group, and 4) CR250 group, CR(250mg/kg) + STZ administered group.

**Results** : Both of CR250 and CR125 groups showed increase in insulin secretion and decrease in the level of serum triglyceride and non-esterified fatty acid in a dose-dependent manner compared to the STZ group. Only CR250 group showed decrease in the levels of glucose and total cholesterol compared to the STZ group. CR herbal acupuncture prevents  $\beta$ -cell damage of pancreatic islet, showing round figure on the sections of the pancreas. In the pancreatic cells, expressions of iNOS, JNK-2, P-JNK-1/2 and ERK-1/2 were decreased compared to the STZ group. CR herbal acupuncture solution did not show any cytotoxicity by MTS assay and inhibited expressions of iNOS and COX-2 in the STZ-induced diabetic rats.

**Conclusions** : Therefore, we suggest that CR herbal acupuncture may act as a prophylactic as well as a therapeutic modality for diabetes mellitus.

**Key words** : Herbal acupuncture, *Cinnamomi Ramulus*, diabetes mellitus, streptozotocin

· 접수 : 2009. 9. 4. · 수정 : 2009. 10. 11. · 채택 : 2009. 11. 17.  
· 교신저자 : 강성길, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 침구학교실  
Tel. 02-958-9200 E-mail : kskacu@hanmail.net

## I. 서론

제1형 당뇨병은 인슐린을 분비하는 췌장 β세포의 파괴와 이에 따른 인슐린 결핍을 특징으로 하는 질병으로 자가면역기전에 의한 췌장 β세포에 발생하는 국소염증반응과 이에 수반하는 β세포의 선택적 파괴에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 인슐린 의존성 당뇨병 발병 초기에 사망한 소아의 췌장 islet에서 임파구의 침윤이 밝혀진<sup>2)</sup> 이래, 췌장 islet 염증의 세포 침윤에는 대식세포 및 T-임파구가 주염증세포임이 보고되었다<sup>3)</sup>. 또한 췌장 islet 염증 시 분비되는 cytokine들이 β세포 파괴에 관여하는 주작용 분자 중의 하나로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 흰쥐와 사람의 췌장 islet에 활성화시킨 단핵구를 넣어 배양했을 때 인슐린 분비 억제와 췌장 islet의 손상이 일어나는데<sup>5)</sup> 이는 주로 interleukin-1(IL-1)에 의한다고 알려진<sup>6)</sup> 이후 당뇨병 발병기전에는 IL-1 이외에도 tumor necrosis factor α (TNF-α), 및 interferon γ(IFN-γ) 등의 다양한 cytokine이 관여한다고 알려졌다<sup>7)</sup>.

계수나무의 어린 가지인 桂枝(*Cinnamomi Ramulus*)는<sup>8)</sup> 녹나무과에 속하는 상록교목으로 性味が 辛甘溫하고 發汗解肌, 溫經通脈, 通陽化氣, 平喘降逆하는 효능을 가지고 있어 風寒感冒, 脘腹冷痛, 血寒經閉, 關節痺痛, 痰飲, 水腫, 心悸, 奔豚 등의 치료에 응용되고 있다<sup>9-11)</sup>. 桂枝藥鍼은 lipopolysaccharide(LPS)에 의해서 유발된 관절염을 억제한다고 알려져 있으며<sup>12)</sup>, 이에 대한 기전으로는 桂枝가 가지고 있는 진통 및 항염증<sup>13)</sup>, 항산화 작용<sup>14)</sup> 등이 보고되고 있다.

또한 계지를 경구 투여했을 때 제2형 당뇨병에서 혈당수치를 10.3~29% 감소시키는 효과가 있다는 임상논문들<sup>15,16)</sup>이 발표되었으며 Paul은 109명의 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 계지 1g씩 투여한 결과 기존의 관리를 받은 경우에 비해 HbA1c가 0.83% 감소하였다고 보고하였다<sup>17)</sup>. 김 등은 실험용 쥐에 있어 소장 의 당 분해 활동이 계지에 의해 증가되었다고 보고하였다<sup>18)</sup>. 이러한 결과를 토대로 계지는 천연 인슐린 sensitizer라고 불리며<sup>19)</sup> 향후 혈당조절에 미치는 효과 및 그 기전에 대한 연구가 기대되고 있다.

이에 저자는 桂枝藥鍼의 췌장세포 손상보호 및 항당뇨 효과를 알아보기 위해 streptozotocin(STZ) 유발 제1형 당뇨병 동물모델 흰쥐의 脾俞(BL<sub>20</sub>)에 3주간 桂枝藥鍼 후 혈액지표와 췌장 islet의 조직변화 및 세포실험을 통해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

5주령의 웅성 Sprague-Dawley(SD) rat을 오리엔트(주)에서 구입한 다음 plastic cage에 보관하여 23±2℃, 상대습도 50±10%, light/dark cycle(12/12hr)의 조건하의 동물실에서 사육하였으며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하였다.

#### 2) 약재

桂枝는 *Cinnamomi Ramulus*의 어린가지를 덕현당(주)에서 구입하여 사용하였다.

#### 3) 桂枝藥鍼液의 제조

陰乾하여 잘 말린 桂枝 600g을 증류수 6,000ml와 함께 약탕기에 넣고 4시간 동안 가열하고 filter paper로 여과한 후 감압 농축하고 freezing dryer로 동결건조(yield : 9.8%)한 다음 normal saline으로 용해시켜 桂枝藥鍼液을 제조하였다.

#### 4) 약침 주입기

1.0ml의 약침 주입기(주사침 26gauge, 녹십자의료공업사, 한국)를 사용하였다.

### 2. 동물실험

#### 1) 취혈 및 실험군 설정

혈위는 흰쥐의 인체상응혈위<sup>20)</sup>에 근거하여 제12늑간, 제12흉추 극돌기하연에서 측방 0.5cm 정도의 함요처인 양측 脾俞(BL<sub>20</sub>)를 취혈하였다.

실험군은 당뇨 유발 시 STZ 대신 citrate buffer solution만을 복강투여한 정상대조군(NC군 : normal control군), STZ 복강투여로 당뇨 유발<sup>21)</sup> 후 다른 처치를 하지 않은 대조군(STZ군 : control군), 당뇨 유발 전후 桂枝 125mg/kg을 약침한 군(CR125군), 당뇨 유발 전후 桂枝 250mg/kg을 약침한 군(CR250군)으로 나누고 각 군당 SD rat 10마리씩 배정하였다. 桂枝藥鍼은 당뇨 유발 1주일 전부터 3주간 매일 피하로 脾俞(BL<sub>20</sub>)에 교대로 약침을 시술하였다.

## 2) Streptozotocin 복강 투여 및 조직적출

정상대조군을 제외한 실험군에 당뇨를 유도하기 위하여 실험시작 1주일 후 동물들을 12시간 絶食한 후 STZ 65mg/kg을 0.1M의 sodium citrate buffer solution(pH 4.5)에 녹여 복강주사하였다. 투여 후 72시간 지나 꼬리정맥에서 채혈한 혈당이 300mg/dL 이상인 동물만 실험에 사용하였다. 당뇨 유발 후 2주간 실험을 유지하여 총 3주간의 실험과정이 종료한 후 실험동물들을 희생시켜 심장채혈 및 췌장적출을 시행하였다.

## 3) 혈액지표 분석

심장채혈을 통해 얻어진 혈액을 5,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 혈장 분석하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose oxidase method(Trinder method)를 사용하여 측정하였으며 흡광도 측정은 UV spectrophotometer(U-3210, HITACHI, Japan)를 사용하였다. 혈중 인슐린 농도는 rat insulin ELISA kit(Shibayagi, Japan)을 구입하여 ELISA reader(Labsystems, Finland)로 측정하였다. 혈중 중성지방(triglyceride, TG), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC)은 아산제약주식회사에서, 유리지방산(non-esterified fatty acid : NEFA)은 신양화학회사에서 각 kit을 구입하여 측정하였다. 간과 신장 기능 효소 지수인 sGOT(serum glutamic oxaloacetic transaminase), sGPT(serum glutamic pyruvic transaminase), ALP(alkaline phosphatase), BUN(blood urea nitrogen) 및 CRE(creatinine)는 STANBIO 회사에서 구입하여 SMART LAB 생화학기기로 측정하였다.

## 4) 췌장조직의 형태학적 관찰

실험동물을 희생시킨 후 적출한 췌장조직을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 blocks을 제작하고 두께 5 $\mu$ m의 관상 절편으로 제작한 후 xylene으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화시켰다. 염색 방법으로는 hematoxylin-eosin 염색으로 탈수 과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

## 5) 단백질 정량 및 western blot

각 실험군의 췌장조직을 동일한 양으로 취하여

PRO-PREP solution에 넣고 homogenization하여 5,000 rpm에서 원심분리 하고 상층액을 취하였다. Bio-Rad DC protein assay 방법을 이용하여 단백질을 정량하고 SDS-PAGE로 전기영동을 하고 nitrocellulose paper로 electro transfer하였다. 단백질이 이동된 membrane은 Ponceau S 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% skim milk 용액으로 1시간 blocking 하였다. 그리고 PBS 완충액으로 1차 antibody와 membrane을 12시간 이상 반응시켰고 TPBS로 3회 세척하였다. 다시 horse-radish peroxidase가 부착된 2차 antibody와 1시간 반응시키고 TPBS로 3회 세척하였다. 그리고 ECL용액으로 2분간 반응한 후 film에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

## 3. 세포실험

### 1) 세포배양

Rat insulinoma(RINm5F) 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin(100U/ml), streptomycin(100U/ml) 및 glutamine을 함유한 RPMI40 배지(Gibco)에 amphotericin B를 2.5 ug/ml 농도로 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### 2) MTS에 의한 세포독성 측정

농도별(0.063, 0.125, 0.250 및 0.50mg/ml) 桂枝藥鍼液이 세포생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt(MTS) assay법을 이용하여 분석하였다. 96 well plate에 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/well의 농도로 RINm5F 세포를 plating하고 桂枝藥鍼液을 농도별로 처리하였다. 24시간 이후 MTS 용액 20 $\mu$ l을 첨가하고 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에 배양시켜 450nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 값을 통해 산출하였다.

### 3) Western blot을 이용한 염증관련 인자 발현 측정

RINm5F 세포를 1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/well의 농도로 6well에 plating하고 하루 동안 안정화시킨 후 桂枝藥鍼液을 0.063mg/ml, 0.125mg/ml 및 0.250mg/ml의 농도로

STZ 10mM과 함께 24시간 처리한 후 iNOS, COX-2 등의 발현을 관찰하였다. 단백질 정량과 western blot은 동물모델 실험의 과정과 동일하다.

#### 4. 통계처리

실험 결과에 대한 통계처리는 mean±standard deviation (S.D.)으로 하였고 의미 있는 차이가 존재했을 때 유의성 검정을 하기 위하여 SPSS(statistical program for social science) Ver 15.0 for Windows를 이용하여 t-test를 사용해 비교하였다.

### Ⅲ. 성 적

#### 1. 혈액지표 분석결과

桂枝藥鍼군의 혈액지표를 STZ군과 비교한 결과 CR250군 및 CR125군 모두에서 인슐린의 농도가 유의하게 증가하였으며 TG 및 NEFA의 수치는 유의하게 감소하였다. Glucose, TC, sGOT, sGPT, ALP 및 BUN은 CR250군에서만 STZ군에 비하여 유의하게 감소하여 농도 의존적인 변화를 보였으며, creatinine은 각 실험군 간 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Table 1).

#### 2. 췌장 islet의 형태학적 관찰

桂枝藥鍼 3주 후 SD rat의 췌장 islet 형태를 hematoxylineosin 염색을 통하여 관찰한 결과 CR250군과 CR125군의 islet의 형태가 STZ군에 비해 더욱 명확하고 원형 모양을 나타내어 桂枝藥鍼군은 STZ로 인한 췌장 islet 손상이 개선되었음을 알 수 있다(Fig. 1).

#### 3. 췌장 조직에서 염증관련 인자의 발현변화

桂枝藥鍼 3주 후 SD rat의 췌장조직에서 염증관련 인자들인 inducible nitric oxide synthase(iNOS), c-jun N terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 발현 변화를 western blot을 이용하여 측정된 결과 iNOS의 발현은 CR125군 및 CR250군에서 각각 STZ군에 비하여 현저히 감소되었고, JNK-2와 P-JNK-2의 발현은 각각 감소되었으나, JNK-1은 발현 변화가 없었고, P-JNK-1의 발현은 STZ군에 비하여 뚜렷하게 감소되었다. 또한 ERK-1 및 ERK-2의 발현은 STZ군에 비하여 감소되었으며 phosphorylation된 P-ERK-2는 변화가 없었고, P-ERK-1은 STZ군에 비하여 발현이 감소하였다(Fig. 2).

#### 4. MTS assay를 이용한 세포독성 측정

桂枝藥鍼液이 RINm5F 세포에 미치는 세포독성을

Table 1. Effects of *Cinnamomi ramulus* (CR) Herbal Acupuncture on Plasma Parameters

	NC	STZ	CR125	CR250
Glucose (mg/dL)	3.9±9.4	378.0±11.8	340.9±34.8	302.8±28.0*
Insulin (ng/ml)	2.18±0.17	0.65±0.03	1.41±0.11 <sup>‡</sup>	1.33±0.14 <sup>‡</sup>
TG (mg/dL)	69.2±3.9	249.7±60.1	118.2±11.5 <sup>†</sup>	73.7±11.4 <sup>‡</sup>
TC (mg/dL)	64.5±2.8	78.6±5.8	69.1±2.6	67.1±1.6*
NEFA (uEq/L)	469±24	806±85	519±74*	510±62*
sGOT (U/L)	119.6±34.7	208.2±26.5	274.7±87.8	130.7±33.6 <sup>†</sup>
sGPT (U/L)	42.5±7.3	86.6±18.0	81.6±13.9	63.9±25.1*
ALP (U/L)	183.5±29.8	317.6±37.5	343.7±75.3	247.0±57.5*
BUN (mg/dL)	14.4±1.4	35.8±6.9	34.7±8.8	25.8±5.1*
CRE (mg/dL)	1.014±0.1	0.91±0.1	1.01±0.05	1.03±0.05

Values represent the mean±S.D. (n=10).

Plasma parameters were analyzed in plasma samples obtained from cardiac puncture performed on the 21st day.

\* : p<0.05, compared to STZ group. † : p<0.01, compared to STZ group. ‡ : p<0.001, compared to STZ group.

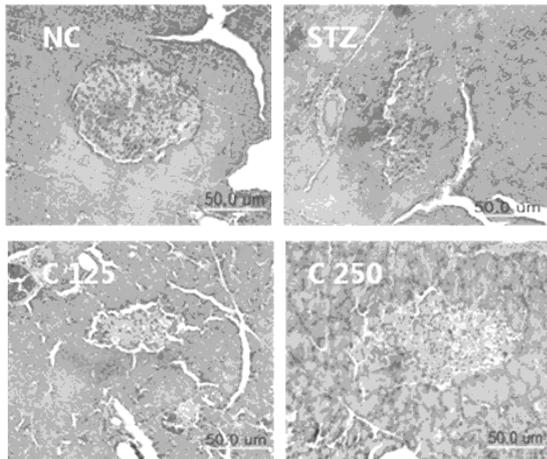


Fig. 1. Protective effect of *Cinnamomi ramulus* (CR) herbal acupuncture at *Bisu*(BL<sub>20</sub>) on pancreatic islets from STZ-induced destruction

Microscopic views on the sections of the pancreas obtained from NC, STZ, CR125, and CR250 groups. H&E, magnification ×200.

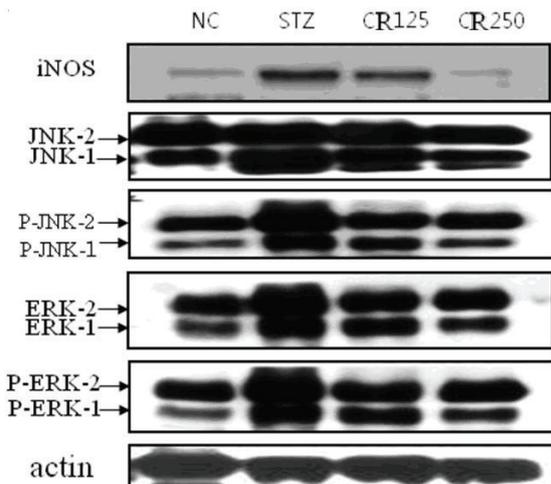


Fig. 2. Effects of CR herbal acupuncture at *Bisu*(BL<sub>20</sub>) for 3 weeks on inflammatory protein expressions in pancreas of STZ induced rats

확인하기 위하여 0.063, 0.125, 0.250 및 0.50mg/ml의 농도별 桂枝藥鍼液이 세포생존에 미치는 영향을 MTS assay법을 이용하여 분석한 결과 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 3).

### 5. RINm5F cell의 염증관련 인자의 발현변화

桂枝藥鍼液이 RINm5F cell의 염증관련 인자의 발

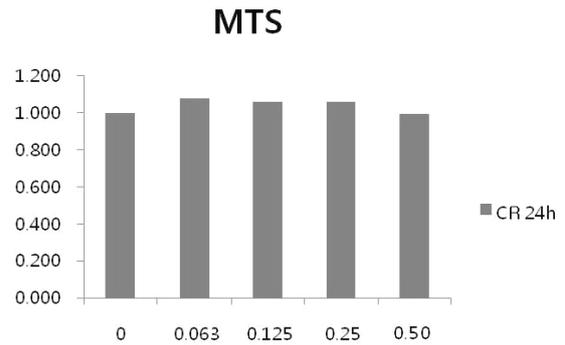


Fig. 3. Effects of CR herbal acupuncture solution on cytotoxicity measured by MTS assay

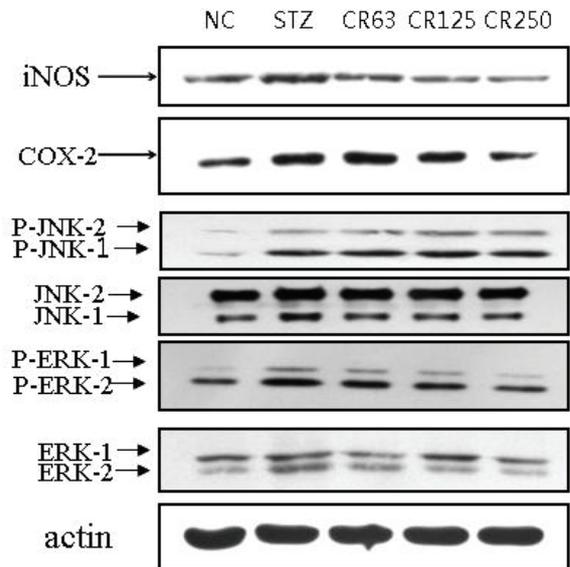


Fig. 4. Effects of CR herbal acupuncture solution on inflammatory protein expressions in rat insulinoma (RINm5F) cells

현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot을 이용하여 염증관련 인자들의 발현변화를 측정된 결과 iNOS와 COX-2의 발현이 0.063, 0.125 및 0.250mg/ml의 桂枝藥鍼液을 처치한 군에서 STZ군에 비해 약간의 감소를 보였으나, 그 외 P-JNK-1/2, JNK-1/2, P-ERK-1/2 및 ERK-1/2의 발현에는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 4).

## IV. 고찰

현대 사회에 들어 급속한 산업화와 경제성장, 서구

화된 식생활 등에 의해 고혈압, 동맥경화, 중풍 등의 순환기계 질환과 함께 당뇨와 같은 내분비계 질환의 발생빈도가 급격히 증가하고 있다. 당뇨병 환자의 경우 그 합병증 발생도 흔히 일어나게 되는데 관상동맥 질환, 뇌혈관질환, 말초혈관 질환을 포함한 동맥경화성 질환의 발생빈도가 높으며 당뇨병에 의한 사망원인의 70~80%를 이러한 합병증이 차지하고 있어<sup>22)</sup> 당뇨의 발병 기전 및 치료를 위한 약물의 연구가 많이 진행되고 있다.

제1형 당뇨병은 유전적 소인<sup>22)</sup>이나 환경적 인자<sup>23)</sup>가 복합적으로 작용하여 발생하는 자가면역 질환으로, 처음 임상적으로 발생할 때는 췌장 islet의  $\beta$ 세포가 90% 이상 이미 파괴되어 있다. 총  $\beta$ 세포 숫자는 islet의 재생과 파괴의 균형에 의해 결정될 수 있지만 islet 세포의 재생에 관해서는 주로 도관 상피세포로부터 유래하리라고 알려진 것<sup>24)</sup> 외에 현재까지는 islet 세포가 파괴되는 기전에 관한 연구가 주로 이루어지고 있다. 세포가 파괴되는 현상은 면역기전과 비면역기전 두 가지에 의해 설명할 수 있으며<sup>25)</sup>, 그 과정이 서서히 진행되는 자가 면역성 췌장 islet 염증에 의한 것으로 설명되고 있다. 사람에서는 그에 해당되는 당뇨병 전구 기간이 수년에 이르므로, 이 시기에 면역요법을 시행하여 당뇨병의 발생을 감소시키려는 노력이 광범위하게 이루어지고 있다. 또한 지속적으로 제1형 당뇨병의 발생기전에 대한 연구가 이루어지면서 세포 독성 T세포 및 여러 가지 cytokine들의 상호작용 및 그 역할들이 알려지고 있으며 이에 의해 유발되는  $\beta$ 세포의 사망과정에 세포자연사가 중요한 기전으로 작용할 것이라는 연구들이 발표되었다<sup>26-28)</sup>.

《神農本草經》을 비롯하여 다양한 본초서에 기재되어 있는 桂枝는 한방에서 해열, 발한, 진통, 진경, 방향성 권위 등 다목적으로 사용되어 왔다<sup>8)</sup>. 현대적 약리작용은 cinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, proto-catechuic acid 등의 화학성분을 함유하여 진정, 진통, 해열, 소염, 항균, 항바이러스 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>. 이와 관련해 최<sup>12)</sup> 등은 LPS 유발 관절염 동물모델에 桂枝藥鍼刺戟을 하여 세포성 면역반응의 변화를 관찰하였고, 박<sup>29)</sup> 등은 카라기난 유도 급성염증 모델과 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 桂枝의 항염증 효과를 확인하였다. 또한 김<sup>30)</sup> 등은 collagen 유발 관절염에서 桂枝가 관절염억제효과가 있음을 보고하였다.

또한 계지는 천연 인슐린 sensitizer라고 불리며<sup>19)</sup> Mang 등<sup>15)</sup>은 79명의 2형 당뇨 환자들을 대상으로 임

상 연구를 한 결과 계지가 혈당수치를 10.3% 감소시키는 효과가 있으며 Hemoglobin A1c(HbA1c), total cholesterol(total-C), low-density cholesterol(LDL-C) 등에는 유의한 변화가 없었다고 보고하였다. Khan 등<sup>16)</sup>은 60명의 제2형 당뇨 환자들을 대상으로 임상연구를 시행한 결과 혈당 수치 18~29% 감소, triglyceride 23~30%, low-density cholesterol(LDL-C)를 7~27% 감소시키는 효과가 있다고 보고하였다.

김<sup>18)</sup> 등은 제2형 당뇨 실험용 쥐에게 계지의 용량을 다르게 하여 투여한 결과 혈당 수치가 계지의 용량에 따라 유의성 있게 줄어드는 것을 발견하였으며 이는 소장에서의 인슐린 민감성을 증가시키고 탄수화물의 흡수를 낮춤으로써 혈당을 억제시키는 효과가 나타난다고 보고하였다.

당뇨의 침구 치료혈로 胃俞, 脾俞, 三陰交, 足三里, 中脘, 腎俞 등이 있는데 이 중 脾俞(BL<sub>20</sub>)는 脾의 背俞穴로 扶土祛水濕, 理脾助運化, 益營血하여 脾胃虛弱 胃腸疾患, 糖尿病, 四肢不收, 浮腫, 多食羸瘦 등에 다용되고 있는 중요한 경혈이다.

본 연구의 당뇨 유발에 사용된 STZ는 D-glucosamine의 N-nitroso 유도체로서 1959~1960년에 streptomyces achromogense로부터 추출되어 항생제로 개발되었던 물질이다<sup>31)</sup>. 항백혈병 치료제<sup>32)</sup>와 발암물질<sup>33)</sup>로도 보고되었는데 1963년 Rakietyen<sup>34)</sup>에 의해 당뇨병 유발이 발견된 이후 당뇨병 모델 연구에 사용되고 있다. STZ의 화학구조상 deoxyglucose 부분에 의해  $\beta$ 세포에 선택적으로 세포막 통과가 향진되고 nitrosourea 부분에 의해 세포 독성이 발생된다. 그러므로 당뇨병의 유발은 STZ에 의한 직접적인  $\beta$ 세포의 작용 때문이라기보다는  $\beta$ 세포에 대한 자가 면역 기전이 유발되어 당뇨병이 발생하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 제1형 당뇨병 동물모델인 STZ으로 유도된 고혈당 SD rat에 桂枝藥鍼을 脾俞(BL<sub>20</sub>)에 시술한 후 혈액지표와 췌장조직형태를 관찰하고, 桂枝藥鍼液으로 rat insulinoma cell을 이용한 세포실험을 통하여 항당뇨 효과와 췌장  $\beta$ 세포의 보호효과를 알아보고자 하였다.

동물실험의 혈액지표 분석에서는 桂枝藥鍼은 STZ에 의해 유발되는 혈중 인슐린 농도 저하를 유의하게 억제시켰으며,  $\beta$ 세포의 파괴에 의한 혈중 glucose, TC, TG 및 NEFA의 상승을 유의하게 억제하였다. 다만 桂枝藥鍼의 STZ에 의해 유발되는 glucose 및 TC 상승 억제 효과는 CR125군에서는 관찰되지 않아 농도의존적인 변화를 보이는 것으로 생각된다.

본 실험에서 STZ 투여 1주일 전부터 투여 2주 후 총 3주간 脾俞(BL<sub>20</sub>)에 桂枝藥鍼을 시술한 후 췌장 조직을 적출하여 췌장 islet의 형태를 관찰한 결과 桂枝藥鍼은 둥글고 원형에 가까운 췌장 islet의 형태를 보였는데, 이러한 결과는 桂枝藥鍼이 STZ에 의해 유도되는 췌장 islet의 손상을 보호할 수 있다는 것을 의미한다.

iNOS는 reactive oxygen species의 일종인 산화질소(NO)를 생성하는데, NO는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이종적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시킨다<sup>35)</sup>.

유도성 동중효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 RA, Crohn's disease, 궤양성 대장염, helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생에도 관여한다<sup>36-38)</sup>.

세포손상에 관여되는 염증반응을 살펴보기 위하여 췌장 조직과 RINm5F cell에서 염증관련 단백질의 발현변화를 western blot 방법으로 측정된 결과 桂枝藥鍼은 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였다. iNOS 및 COX-2의 발현은 transcription factor인 nuclear factor kappa B(NF-κB)의 활성화 유도로 이루어지므로<sup>32)</sup> 桂枝藥鍼의 iNOS와 COX-2의 발현억제는 NF-κB의 억제와도 관련이 있을 것으로 생각되며 이와 관련된 추가 연구가 필요할 것이라 사료된다.

Mitogen-activated protein kinases(MAPKs)는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38 MAPK, c-jun N-terminal kinase(JNK)로 크게 구분된다<sup>39,40)</sup>. 성장인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고, 자외선 등의 stress, TNF 등의 염증성 cytokine은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화하고 MAPKs는 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막으로부터 핵으로 전달한다<sup>41,42)</sup>. 그러나 이 경로들은 완전히 독립된 것이 아니어서 자극이나 세포의 종류에 따라서 여러 가지의 MAPK가 서로 다른 정도로 활성화되고, 이에 따라 서로 다른 기질을 서로 다른 정도로 인산화 함으로써 다양한 신호에 따르는 세포 반응의 특이성을 나타내는 것으로 추정된다.

桂枝藥鍼은 췌장 조직에서 JNK-1/2, ERK-1/2 등의 발현을 억제하였다. 이는 streptozotocin에 의해서 유발되는 췌장 islet 세포의 염증 및 사멸을 막아 췌장 β세포의 보호효과를 나타내는 것으로 생각된다.

위의 결과들을 종합해보면 桂枝藥鍼은 STZ에 의해 유발되는 췌장의 islet 세포손상을 iNOS, COX-2, JNK-1/2 및 ERK-1/2 등의 발현 억제를 통하여 농도 의존적으로 췌장세포를 보호하고 항당뇨 효과를 나타낼 수 있는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

桂枝藥鍼의 췌장 β세포의 보호효과와 항당뇨 효과를 알아보기 위해 STZ로 유도된 고혈당 SD rat의 脾俞(BL<sub>20</sub>)에 桂枝藥鍼을 3주간 처치한 후 혈액지표와 췌장조직형태를 관찰하고, rat insulinoma cell을 이용하여 桂枝藥鍼에 대한 세포실험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 桂枝藥鍼은 동물실험의 혈액지표 분석에서 STZ에 의해 유발된 혈중 인슐린 농도의 저하를 유의하게 억제시키고, 혈중 glucose, TC, TG 및 NEFA의 상승을 유의하게 억제하였다.
2. 桂枝藥鍼은 STZ에 의해 유발된 췌장 islet 손상을 개선하여 더 명확한 원형 형태로 유지시켰다.
3. 桂枝藥鍼은 췌장 조직에서 iNOS, JNK-2, P-JNK-1/2 및 ERK-1/2의 발현을 억제시켰다.
4. 桂枝藥鍼은 RINm5F 세포에서 세포 독성을 나타내지 않았다.
5. 桂枝藥鍼은 RINm5F 세포에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였다.

## VI. 참고문헌

1. Park YS, Eisenbarth GS. Natural history of type 1 diabetes. In: S Taylor, D LeRoith, J Olefsky etc. Textbook of diabetes mellitus. Philadelphia and New York : Lippincott Raven Company. 2000 : 2-39.
2. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in

- juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965 ; 14 : 619-33.
3. Sibley RK, Sutherland DE, Goetz F, Michael AF. Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso-and allograft. A light and electron microscopic and immunohisto-chemical analysis of four cases. *Lab Invest*. 1985 ; 53 : 131-44.
  4. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PGF, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med*. 1985 ; 313 : 353-60.
  5. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nielsen H, Bendixen G, Nerup J. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy*. 1965 ; 40 : 424-9.
  6. Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen HJ, Dinarello CA, Svenson M. Cytotoxicity of human p17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science*. 1986 ; 232 : 1545-7.
  7. Wei Chen, Konstantin V. Salojin, Qing-sheng Mi, Marsha Grattan, T Craig Meagher, Peter Zucker and Terry L Delovitch. Insulin-like growth factor (IGF)-I/IGF-binding protein-3 complex : therapeutic efficacy and mechanism of protection against type 1 diabetes. *Endocrinology*. 2003.
  8. 서부일, 최호영. 임상한방본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 126-9.
  9. 김호철. 한약약리학. 과주 : 집문당. 2001 : 66-7.
  10. 著者 未詳. 神農本草經. 台北 : 文光圖書有限公司. 1982 : 91.
  11. 章永紅 編著. 抗癌中藥大全. 南京 : 江蘇科學技術出版社. 2000 : 341.
  12. 최유행, 김갑성, 이승덕. 桂枝藥鍼刺戟이 mouse의 LPS 유발 관절염 중 세포면역성반응에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2001 ; 18(1) : 100-12.
  13. 박중은, 최혁재, 정석희, 김남재, 김동현. 빈용한약재의 진통 소염활성. *생약학회지*. 2001 ; 32(4) : 257-68.
  14. 박명준, 박용기. 계피나무의 부위별 抗酸化 作用에 관한 연구(I). *대한본초학회지*. 2000 ; 15(2) : 45-55.
  15. Mang B, Wolters M, Schmitt B, Kelb K, Lichinghagen R, Stichtenoth DO, Hahn A. Effects of a cinnamon extract on plasmagluucose, HbA1c, and serum lipid in diabetes mellitus type 2. *Eur J Clin Invest*. 2006 ; 36 : 340-4.
  16. Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003 ; 26(12) : 3215-8.
  17. Paul Crawford. Effectiveness of Cinnamon for Lowering Hemoglobin A1C in Patients with Type 2 Diabetes : A Randomized, Controlled Trial. *JABFM*. 2009 ; 22 (5) : 507-12.
  18. Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol*. 2006 ; 104(1-2) : 119-23.
  19. Dugoua JJ, Seely D, Perri D, Cooley K, Forelli T, Mills E, Koren G. From type 2 diabetes to antioxidant activity : a systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007 ; 85(9) : 837-47.
  20. Yin CS, Jeong HS, Park HJ, Baik YS, Yoon MH, Choi CB, Koh HK. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. *Research in Veterinary Science*. 2008 ; 84 : 159-5.
  21. Muniappan L, Leelavinothan P, Sandhya S, Ramesh B. Insulin-secretagogue activity and cytoprotective role of the traditional antidiabetic plant *Scoparia dulcis*(sweet broomweed). *Life Sciences*. 2004 ; 75 : 2003-14.
  22. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1987 ; 329 : 599-604.
  23. Yoon JW. Role of viruses and environmental factors in induction of diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990 ; 4 : 95-123.
  24. Vinik A, Pittenger G, Rafaeloff R, Rosenberg L, Duguid W. Determinants of pancreatic islet cell mass : a balance between neogenesis and senescence/apoptosis. *Diabetes Rev*. 1996 ; 4 : 235-63.
  25. Gepts W, Lecompte PM. The pancreatic islets in

- diabetes. *Am J Med.* 1980 ; 70 : 105-15.
26. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Apoptosis is the mode of  $\beta$  cell death responsible for the development of IDDM in the NOD mouse. *Diabetes.* 1997 ; 46 : 750-7.
  27. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Beta cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low dose streptozotocin model. *J Patho.* 1996. 178 ; 176-81.
  28. Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD.  $\beta$  cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 ; 94 : 213-8.
  29. 박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모, 최일환, 김수영, 심범상, 이계현, 임사비나. 계지의 항염 효과에 관한 연구. *대한한의학회지.* 2005 ; 26(2) : 140-51.
  30. 김성준, 박성민, 강희, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 桂枝의 collagen 유발 관절염에 대한 소염 효과-DBA/1J mouse에서의 병태 관찰 및 RAW 264.7에서의 cytokine 분비 측정-. *동의생리병리학회지.* 2008 ; 22(3) : 542-7.
  31. Herr RR, Eble TE, Berby ME, Jahnke HK. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiol Annu.* 1959 : 236.
  32. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic actions of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep.* 1963 ; 29 : 91.
  33. Evans JS, Gerritsen GC, Mann KM, Owen SP. Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin and its cofactor. *Cancer Chemother Rep.* 1965 ; 48 : 1.
  34. Arison RN, Feudale EL. Induction of renaltumor by streptozotocin in rats. *Nature.* 1967 ; 214 : 1254.
  35. Baeuerle PA. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structure : at the interface of inflammation control. *Cell.* 1988 ; 95 : 729-31.
  36. Morise Z, Komatsu S, Fuseler JW, Granger DN, Perry M, Issekuts AC, Grisham MB. ICAM-1 and P-selectin expression in a model of NSID-induced gastropathy. *Am J Physio.* 1998 ; 27 : 246-52.
  37. Li YX, Li N, Li YS, Wu B, Li JS. Upregulated intragraft gene expression, ICAM-1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allografts. *Transplant Proceed.* 2000 ; 32 : 1283-6.
  38. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 1993; 17(2) : 38-40.
  39. Tamura S, Hanada M, Ohnishi M, Katsura K, Sasaki M, Kobayashi T. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem.* 2002 ; 269 : 1060-6.
  40. Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 2003 ; 63 : 8271-7.
  41. Chun JS. Expressin, activity, and regulation of MAP kinases in cultured chondrocytes. *Medhtods Mol Med.* 2004 ; 100L 291-306.
  42. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation on mammalian cells. *Cell research.* 2002 ; 12 : 9-18.