

## 加味五苓散이 Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 糖尿病性 腎症에 미치는 영향

이연경, 강석봉  
대구한의대 한의과대학 신계내과학교실

### The Effects of *Gamioryung-san* Extracts on Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Rats

Yeon-kyeong Lee, Seok-bong Kang

Dept. of Oriental Internal Medicine, Graduate School of Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The object of this study was to observe the effects of *Gamioryung-san* (GOS), which consists of 22 types of herbs, on streptozotocin (STZ)-induced diabetic nephropathy rats.

**Methods :** Three different dosages of GOS were orally administered once a day for 28 days from 3 weeks after STZ treatment. Six groups, each of 8 rats per group were used. Changes on the body weights, blood glucose levels, serum BUN and creatinine levels, urine volumes, and UAER were observed with changes on the kidney malondialdehyde contents and glutathione, dismutase and catalase contents. In addition, histopathology of kidney, pancreas, thymus and spleen were observed. The results were compared with antioxidant silymarin 100 mg/kg, of which the effects on STZ-induced diabetes and related complications are already confirmed.

**Results :** As a result of treatment of GOS 800, 400 or 200 mg/kg for 28 days, STZ-induced decreases of body weights, hyperglycemia, atrophic changes of pancreatic islets with decreases of insulin-immunoreactive cells and decreases of glucagon-immunoreactive cells were inhibited dose-dependently. Increases in kidney weight, serum BUN and creatinine levels, urine volumes, UAER, vasodilated atrophic glomerulus and abnormal tubules were inhibited dose-dependently. Also increases of kidney MDA contents and decreases of GSH contents, SOD and CAT activities, decreases of thymus and spleen weights, and atrophic changes at histopathological observation were also inhibited. The effects of GOS 400 mg/kg showed similar effects to silymarin 100 mg/kg.

**Conclusions :** These results suggest that 400 mg/kg of GOS retarded the STZ-induced diabetic nephropathies as similarly to silymarin 100 mg/kg, through modulations of oxidative stress and immune systems.

**Key words :** *Gamioryung-san* (*Jiaweiwuling-san*), diabetes, diabetic nephropathy, Streptozotocin

## 1. 서론

당뇨병성 신증은 심혈관계 손상에 이어 두 번째

로 흔한 당뇨병의 합병증으로, 최근 들어 말기 신 질환의 가장 흔한 원인질환으로 대두되었다<sup>1</sup>. 당뇨병성 신증은 초기에는 고혈당과 사구체여과율의 증가를 동반하며 30~300 mg/day의 미세알부민뇨로 시작하여 점차 사구체 여과율의 감소와 함께 단백뇨 배설의 증가가 지속된다<sup>1</sup>. 병리학적으로는 사구

· 교신저자: 강석봉 대구시 수성구 상동 165번지  
대구한의대학교 신계내과학교실  
TEL: 053-770-2232 FAX: 053-770-2055  
E-mail: kangsb@dhu.ac.kr

체와 세뇨관의 비후, 메산지움과 세뇨관-간질에 세포의 기질 축적 그리고 사구체기저막과 신세뇨관 기저막의 비후가 나타난다. 또한 사구체와 세뇨관-간질에 염증세포의 침윤이 있고, 사구체 내 족세포 수의 감소와 족돌기의 융합이 일어나며, 이러한 현상들의 지속적인 진행으로 인해 결국 사구체 경화와 신세뇨관 위축이 발생한다<sup>2</sup>.

현재 주로 장기간의 고혈당 상태에 의해 이차적으로 유발되는 것으로 알려져 있고, 이 과정에서 산화 스트레스, 염증인자 또는 면역계 특히 면역억제가 서로 긴밀하게 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>3,4</sup>. 특히 free radical에 의한 항산화 방어기전의 변화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 항산화 효과가 입증되어 있는 천연물의 당뇨병 치료제 개발이 활발히 진행되고 있다<sup>5,6</sup>.

본 실험에서 사용된 加味五 散은 대구한의대 부속 한방병원에서 陽虛水泛으로 변증되는 만성的小便不利, 尿濁, 浮腫 등 증에 임상 사용되는 처방으로 streptozotocin(STZ) 유발 당뇨병 흰쥐의 당뇨병성 신증에 본 처방이 얼마나 유효한지 알아보기 위해 본 실험에 사용하였다.

加味五 散 물 추출물을 STZ 투여 21일 후부터 매일 200, 400 및 800 mg/kg의 농도로 각각 28일간 경구투여하고 혈당, 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 변화, 요량 및 알부민 분비율의 변화를 관찰하였으며, 항산화 효과를 관찰하기 위해 신장 내 glutathione (GSH), superoxide dismutase(SOD) 및 catalase(CAT) 함량을 측정하였고, 지질과산화(lipid peroxidation)에 미치는 영향을 관찰하기 위해 malondialdehyde (MDA) 함량을 각각 측정하였다. 또한 췌장섬의 수, 췌장섬 내 insulin 및 glucagon 면역반응세포의 수적 변화, 신장과 가슴샘 및 비장의 조직병리학적 변화를 각각 관찰하였다. 실험결과는 천연물 유래 항산화제인 silymarin 100 mg/kg 투여군과 각각 비교하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

6주령 된 평균 136.4±0.233 g의 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 실험 전 기간동안 온도(20-25 °C)와 습도(30-35%), 명암 주기(12시간)를 조절하였으며 사료(Superfeed Co., Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 사료의 조성은 Table 1과 같다. 암컷을 사용한 이유는 비교적 체중이 가벼워 실험물질의 적은 양으로도 효과적인 실험이 가능하기 때문이다. 본 실험에 사용된 모든 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 및 대구한의대학교 실험동물윤리위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

Table 1. Formulas of Rodent Pellet Diets (Superfeed Co., Korea).

	Casein	200
	L-Cystein	3
	Cornstarch	150
	Sucrose	500
Ingredient (g/kg diet)	Cellulose	50
	Soybean Oil	50
	Lard	0
	Mineral mixture	35
	Vitamin mixture	10
	Cholinebitartrate	2
	Energy (kcal/g)	
Protein (% kcal/kg)		13.3
Carbohydrate (% kcal/kg)		47.4
Fat (% kcal/kg)		8.0
Fiber (% kcal/kg)		8.0

#### 2) 약재

약재는 지역 약업사(옴니허브, 영천, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 加味五 散 1 貼 분량의 조

성은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of *Gamioryung-san*.

Herbs	Scientific name	Korean name	Produce Region	Amounts (g)
Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	[黃芪]	Chungbuk	10
Polyporus	<i>Polyporus umbellatus</i> Fries	[豬苓]	China	8
Alismatis Rhizoma	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	[澤瀉]	Chungnam	8
Atractylodes rhizome white	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	[白朮]	China	6
Hoelen White	<i>Poria cocos</i> Wolf	[白茯苓]	China	6
Artemisiae Scopariae Herba	<i>Artemisia scoparia</i> Waldstein et Kitamura	[茵陳]	Chungbuk	5
Tokoro Rhizoma	<i>Dioscorea tokora</i> Makino	[草薺]	China	5
Nelumbinis Semen	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	[蓮子肉]	China	5
Alpinia oxyphyllae Fructus	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miquel	[益智仁]	China	4
Plantaginis Semen	<i>Plantago asiatica</i> L	[車前子]	China	4
Dioscoreae Rhizoma	<i>Dioscorea japonica</i> Thunberg	[山藥]	Gyeongbuk	4
Amomi Fructus	<i>Amomum villosum</i> Loureiro	[砂仁]	China	4
Mantidis Ootheca	<i>Paratenodera sinensis</i> De Saussure	[桑螵蛸]	China	4
Remotiflori Radix	<i>Adenophora remotiflorus</i> Miquel	[薺萐]	Chungbuk	4
Myristicae Semen	<i>Myristica fragrans</i> Houttuyn	[肉荳蔻]	Indonesia	4
Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	[甘草]	China	3
Chebulae Fructus	<i>Terminalia chebula</i> Retzius	[訶子]	China	3
Fossilia Osis Mastodi	-	[龍骨]	China	3
Schisandrae Fructus	<i>Schisandra chinensis</i> Baill	[五味子]	Gyeongbuk	2
Mume Fructus	<i>Prunus mune</i> Sieb. et Zucc	[烏梅]	China	2
Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	[人蔘]	Chungnam	2
Cinnamomi Cortex	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	[肉桂]	Vietnam	2
Total	22 types			98

## 2. 방법

### 1) 加味五苓散 추출물 제조

선정된 약재 20貼 분량(1,960 g)을 취하여 정제수 20 l로, 60°C에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음, programmable freeze dryer(Labconco Freezone1, Labconco Corp, MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜 총 308.70 g(수율 약 15.75 %)의 갈색 추출물

을 얻어 실험에 사용하였다. 추출한 加味五苓散 동결 건조물은 -20 °C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 용매인 증류수에 160 mg/ml의 농도까지 갈색으로 비교적 잘 용해되었다.

### 2) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 8마리씩 정상군, STZ 대조군, silymarin 투여군, 가미오령산 200, 400, 800 투여군의 6그룹으로 구분하였다. 加味五苓散 추출물 및 silymarin은 각각 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg 당 5 ml의 용량으로 STZ 투여 21일 후부터,

매일 1회씩 28일간 금속제 zonde가 부착된 3 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여하였다. 본 실험에 사용한 silymarin 투여용량은 이전에 당뇨병성 신증에 확실한 효과를 나타낸 100 mg/kg을 선정하였으며, 加味五苓散의 최고 투여용량인 800 mg/kg은 임상 사용량을 기초로 하여 선정하였다<sup>7</sup>.

### 3) 당뇨병 및 당뇨병 합병증의 유발

당뇨병 및 당뇨병합병증을 유발하기 위하여 STZ (Sigma, MO, USA) 60 mg/kg을 50 mM citrate buffer에 용해시켜 실험물질 투여 3주 전에 실험동물 체중 kg당 5 ml의 분량으로 23 gauge의 needle이 부착된 3 ml 주사기로 단회 복강투여하였다. STZ 투여 21일 후 혈당이 350 mg/ml 이상이 되는 경우 당뇨병이 유발되었다고 생각하고 실험에 사용하였다. 정상 대조군에서는 STZ 대신 50 mM citrate buffer만 동일한 방법으로 투여하였다.

### 4) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 STZ 투여일, 실험약재 투여 시작일, 투여 7, 14, 21, 27일 및 최종 희생일에 각각 측정하였다. 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 STZ 투여일, 실험약물 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식시켰고, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 당뇨병 및 당뇨병 합병증 유발기간인 3주간의 체중변화와 실험약물 투여 후 4주간의 체중 변화량을 각각 측정하였다.

### 5) 장기 중량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 좌측 신장, 가슴샘 및 비장을 적출하여 분리한 다음 각각의 중량을 측정하여 절대 중량으로 하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 각각의 장기 상대 중량을 산출하였다.

### 6) 혈당의 측정

STZ 투여 21일 후 및 최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 안와정맥총에서 NaF glucose vacuum tube(Becton Dickinson, USA)에 약 0.3 ml의 혈액을 채취한 다음 3,000 rpm으로 원

심분리하여 혈장을 분리하였다. 이후 자동혈액분석장치(Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈당을 각각 측정하였다.

### 7) 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 측정

STZ 투여 21일 후 및 최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 안와정맥총과 후대정맥에서 각각 약 0.5 및 6 ml의 혈액을 채취하였으며, 상온에서 1시간 정도 방치한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이후 자동혈액분석장치(Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈중 BUN 및 creatinine 함량을 각각 측정하였다.

### 8) 요량 및 요중 알부민 분비율의 산출

최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 하면서, 24시간 동안의 총 배요량을 개체별로 각각 측정하였으며, 뇨중 알부민량은 Micro-Albumin test kit(Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc, CA, USA)를 이용하여, Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) 방법으로 각각 측정하였고, 요중 알부민 분비량(Urinary albumin excretion rate)은 측정된 요중 알부민량과 요량을 이용하여 측정하였다.

### 9) 신장 항산화 방어 system의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 회복하여, 우측 신장을 적출한 다음, 멸균 생리 식염수로 세척하고 주변 지방조직을 제거하였다. 이후 Kavutcu et al.<sup>8</sup>의 방법으로 MDA 및 GSH 함량, SOD 및 CAT 활성 역시 각각 측정하였다. 조직 내 단백질 함량은 Lowry et al.<sup>9</sup>의 방법으로 측정하였으며, 지질과산화 정도는 Draper and Hadley<sup>10</sup>의 방법으로 측정하였다. 또한 항산화 정도를 Eyer and Podhradsky<sup>11</sup>의 방법으로 측정하였다. SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich<sup>12</sup>의 방법에 따라 평가하였다.

### 10) 조직병리학적 관찰

최종 희생일에 장기 중량 측정 후, 췌장(비장엽), 좌측 신장, 가슴샘 및 비장을 적출한 다음 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 실시하고 광학현미경 하에서 관찰하였다. 가슴샘 피질 및 전체

두께, 비장 두께, 백색수질 수 및 평균 직경을 각각 CCD image analyzer(DMI-300, DMI, Korea)를 이용하여 각각 측정하였다.

11) 면역조직화학적 관찰

준비한 췌장 절편을 이용하여 Avidine-Biotin-Peroxidase Complex(ABC) 방법<sup>13</sup>으로 insulin 및 glucagon 생산세포를 염색하였다. 발색 이후 Mayer's Hematoxylin으로 대조염색을 실시하고, 광학현미경하에서 관찰하였다. 본 실험에서 10% 이상의 발색 반응을 나타내는 세포를 양성 면역반응세포로 간주하고 총 1000개의 islet 세포 중 insulin 및 glucagon 면역반응세포의 수를 각각 CCD image analyzer (DMI-300, DMI, Korea)를 이용하여 산출하였다<sup>14</sup>.

3. 통계처리

모든 수치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences(LSD) test로 사후 검증

을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 Mann-Whitney U(MW) test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc, USA)를 이용하여 평가하였으며, *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 체중의 변화

加味五苓散 800 투여군에서는 加味五苓散 800 mg/kg 투여 14일부터 STZ 대조군에 비해 유의성 있는(*p*<0.01) 체중, 증체량증가를 나타내었다. 加味五苓散 400 투여군에서도 투여 14일부터 STZ 대조군에 비해 유의성 있는(*p*<0.05) 체중, 증체량증가를 나타내었다. 加味五苓散 200 투여군에서도 투여 27일 후부터 STZ 대조군에 비해 유의성 있는(*p*<0.05) 체중, 증체량증가를 나타내었다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Changes on the Body Weight Gains after STZ and Test Article Administration.

Groups	Body weights at			Body weight gains during		
	STZ treatment	21 days after STZ treatment	Sacrifice	Diabetes inducing periods	During treatment periods	
Controls	Intact	136.25±4.17	188.38±10.11	234.88±14.78	52.23±7.55	49.88±11.34
	STZ	136.00±7.21	131.25±8.83*	125.13±5.67*	-4.75±9.36*	1.75±7.59*
	Silymarin 100	136.50±5.71	130.63±6.89*	148.38±10.47**	-5.88±9.17*	23.50±12.82**
GOS treated as	800	136.50±7.03	131.88±12.23*	160.25±14.26**	-4.64±6.67*	34.00±9.44**
	400	136.38±5.93	131.13±8.04*	146.25±9.42**	-5.25±5.37*	21.63±11.62**
	200	136.75±5.12	132.00±6.72*	140.88±9.39**	-4.75±4.95*	15.63±9.88**

Note that the body weights in STZ control were significantly (*p*<0.01) decreased from 3 weeks after STZ treatment, at start of test article administration. However, these body weight decreases were significantly (*p*<0.01 or *p*<0.05) inhibited by treatment of silymarin and GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ controls, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats (gram).

STZ : streptozotocin

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

\**p*<0.01 as compared with intact control by LSD test

†*p*<0.01 and ‡*p*<0.05 as compared with STZ control by LSD test

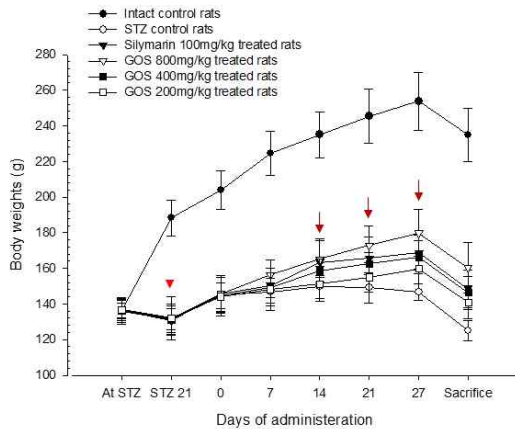


Fig. 1. Body weight changes after STZ and test article administration.

Note that the body weights in STZ control were significantly ( $p < 0.01$ ; arrowhead) decreased from 3 weeks after STZ treatment, at start of test article administration. However, these body weight decreases were significantly ( $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ ; arrow) inhibited by treatment of silymarin and GOS 800, 400 and 200 mg/kg from 14, 21 or 27 days after start of test article treatment as compared with STZ controls, respectively.

Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats (gram).

STZ : streptozotocin

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

At STZ, at STZ treatment day

STZ 21, at 21 days after STZ treatment day

0 means, at start of test article administration

All animals at STZ treatment day, sacrifice and Day 0 were overnight fasted.

## 2. 신장 중량의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 신장 절대 및 상대 중량의 감소가 관찰되었다(Fig. 2).

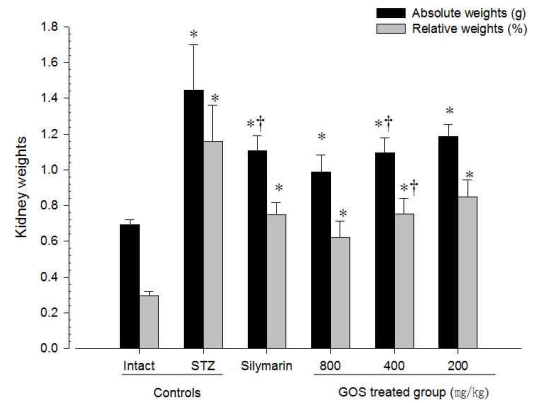


Fig. 2. Changes on the kidney weights after STZ and test article administration.

Note that the absolute and relative kidney weights were significantly increased in STZ control as compared with intact control. However, these kidney weight increases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by MW test

† $p < 0.01$  and ‡ $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

## 3. 가슴샘 중량의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 가슴샘 절대 및 상대 중량의 증가가 관찰되었다(Fig. 3).

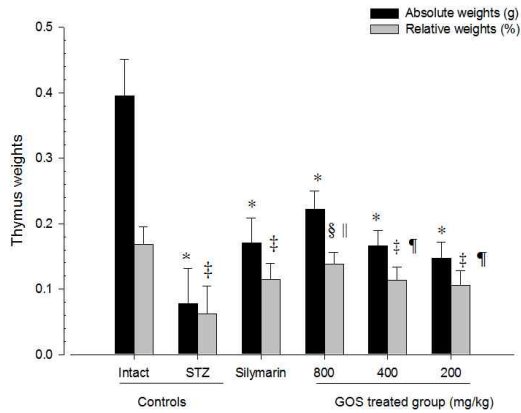


Fig. 3. Changes on the thymus weights after STZ and test article administration.

Note that the absolute and relative thymus weights were significantly decreased in STZ control as compared with intact control. However, these thymus weight decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.  
 GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts  
 STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test

† $p < 0.01$  as compared with STZ control by LSD test

‡ $p < 0.01$  and § $p < 0.05$  as compared with intact control by MW test

|| $p < 0.01$  and ¶ $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

#### 4. 비장 중량의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 비장 절대 및 상대 중량의 증가가 각각 관찰되었다(Fig. 4).

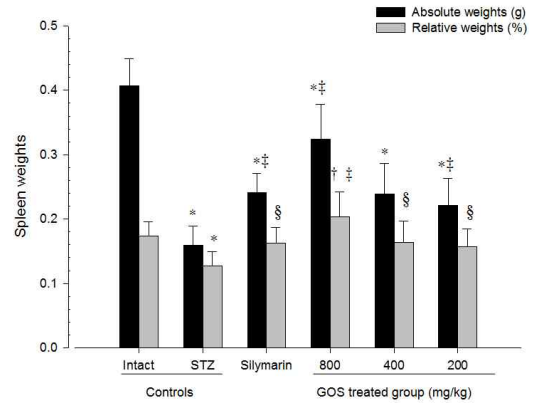


Fig. 4. Changes on the spleen weights after STZ and test article administration.

Note that the absolute and relative spleen weights were significantly decreased in STZ control as compared with intact control. However, these spleen weight decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.  
 GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  and † $p < 0.05$  as compared with intact control by LSD test

‡ $p < 0.01$  and § $p < 0.05$  as compared with STZ control by LSD test

#### 5. 혈당의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 최종 희생일의 혈당 및 투여 전후 혈당 변화량의 감소가 관찰되었다(Table 4).

#### 6. 혈중 BUN 함량의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 최종 희생일의 혈중 BUN 함량 및 투여 전후 혈중 BUN 함량 변화량의 감소가 관찰되었다(Table 5).

Table 4. Changes on the Blood Glucose Levels after STZ and Test Article Administration.

Groups	Blood glucose levels			
	At 3 weeks after STZ treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)	
Controls	Intact	113.50±8.35	117.75±6.90	4.25±3.54
	STZ	380.25±25.29*	685.38±108.81*	305.13±110.10*
	Silymarin	384.50±29.47*	520.13±66.34*‡	135.63±78.00*§
GOS treated as	800	382.75±27.62*	434.13±55.40*‡	51.38±57.65*‡
	400	382.00±25.99*	522.00±54.54*‡	140.00±37.71**
	200	377.88±30.77*	552.38±63.75*§	174.50±79.71*§

Note that the blood glucose levels were significantly increased in STZ control as compared with intact control. However, these blood glucose levels increases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats (mg/dl).

STZ : streptozotocin

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

\* $p < 0.01$  and † $p < 0.05$  as compared with intact control by MW test

‡ $p < 0.01$  and § $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

Table 5. Changes on the Serum BUN Levels after STZ and Test Article Administration.

Groups	Serum BUN levels			
	At 3 weeks after STZ treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)	
Controls	Intact	21.00±3.59	28.00±5.76	7.00±5.86
	STZ	43.38±5.24*	100.50±12.92†	57.13±14.04*
	Silymarin	43.25±2.82*	75.63±7.65*§	32.38±9.40**
GOS treated as	800	44.13±4.91*	65.75±12.75*§	21.63±11.30*‡
	400	43.25±3.82*	76.00±10.89*§	32.75±9.59*‡
	200	44.00±5.01*	75.50±8.04*	41.50±4.69*‡

Note that the serum BUN levels were significantly increased in STZ control as compared with intact control. However, these serum BUN levels increases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats (mg/dl).

STZ : streptozotocin

BUN : blood urea nitrogen

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test

† $p < 0.01$  as compared with STZ control by LSD test

‡ $p < 0.01$  as compared with intact control by MW test

§ $p < 0.01$  and || $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

7. 혈중 creatinine 함량의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$

또는  $p < 0.05$ ) 최종 희생일의 혈중 creatinine 함량 및 투여 전후 혈중 creatinine 함량 변화량의 감소가 관찰되었다(Table 6).



Table 6. Changes on the Serum Creatinine Levels after STZ and Test Article Administration.

Groups	Serum creatinine levels		
	At 3 weeks after STZ treatment (A)	At sacrifice, end of 28 days of test article treatment (B)	Changes after test article treatment (B-A)
Intact	0.65±0.12	0.79±0.14	0.14±0.05
Controls	STZ 0.93±0.14*	1.86±0.23*	0.94±0.24 <sup>  </sup>
	Silymarin 0.94±0.12*	1.41±0.32* <sup>‡</sup>	0.48±0.26 <sup>  **</sup>
GOS treated as	800 0.91±0.12*	1.14±0.22* <sup>‡</sup>	0.23±0.21**
	400 0.94±0.18*	1.43±0.35* <sup>‡</sup>	0.49±0.39 <sup>††</sup>
	200 0.91±0.15*	1.51±0.25* <sup>‡</sup>	0.60±0.31 <sup>††</sup>

Note that the serum creatinine levels were significantly increased in STZ control as compared with intact control. However, these serum creatinine levels increases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats (mg/dl).

STZ : streptozotocin

GOS : *Gamiorjung-san* aqueous extracts

\* $p < 0.01$  and <sup>‡</sup> $p < 0.05$  as compared with intact control by LSD test

<sup>‡</sup> $p < 0.01$  and <sup>§</sup> $p < 0.05$  as compared with STZ control by LSD test

<sup>||</sup> $p < 0.01$  and <sup>¶</sup> $p < 0.05$  as compared with intact control by MW test

\*\* $p < 0.01$  and <sup>††</sup> $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

8. 요량의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 요량의 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

9. 요중 알부민 분비율의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 요중 알부민 분비율의 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

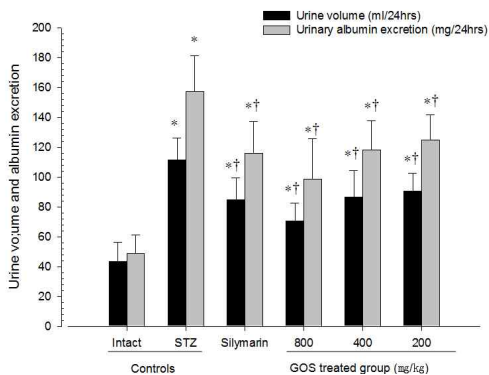


Fig. 5. Changes on the urine volume and urinary

albumin excretion rates after STZ and test article administration.

Note that the marked and significant increases of urine volume and urinary albumin excretion rates were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these urine volume and urinary albumin excretion rates increases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamiorjung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test

<sup>‡</sup> $p < 0.01$  as compared with STZ control by LSD test

10. 신장 내 항산화 방어 system의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 신장 내 MDA함량의 감소, GSH 함량, SOD 및 CAT 활성의 증가가 관찰되었다(Table 7).

Table 7. Changes on the Kidney Antioxidant Defense Systems after STZ and Test Article Administration.

Groups	Kidney antioxidant defense systems				
	Malondialdehyde (nM/g protein)	Glutathione (μM/g protein)	Superoxide dismutase (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	
Controls	Intact	95.75±15.90	133.00±33.39	184.75±26.94	368.25±80.30
	STZ	206.13±12.18*	34.50±10.58 <sup>  </sup>	112.63±18.85*	214.88±24.42 <sup>  </sup>
	Silymarin 100 mg/kg	140.88±28.41**	59.63±12.18 <sup>  **</sup>	141.00±15.00**	270.88±29.93 <sup>  **</sup>
GOS treated as	800 mg/kg	121.63±26.20*‡	76.75±20.59 <sup>  **</sup>	155.13±11.72*‡	296.50±20.32*‡**
	400 mg/kg	144.88±27.68*‡	56.63±16.78 <sup>  **</sup>	139.38±19.12*‡	267.88±21.00 <sup>  **</sup>
	200 mg/kg	159.00±16.40*‡	48.13±11.06 <sup>  **</sup>	135.25±12.67*‡§	259.13±35.74 <sup>  **</sup>

Note that kidney MDA contents were significantly increased while kidney GSH contents, SOT and CAT activities are decreased in STZ control as compared with intact control. However, these increases of MDA contents, decreases of GSH contents, SOD and CAT activities were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats (mg/dl).

STZ : streptozotocin

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

\* $p < 0.01$  and † $p < 0.05$  as compared with intact control by LSD test

‡ $p < 0.01$  and § $p < 0.05$  as compared with STZ control by LSD test

<sup>||</sup> $p < 0.01$  and <sup>||</sup> $p < 0.05$  as compared with intact control by MW test

\*\* $p < 0.01$  and <sup>++</sup> $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

### 11. 췌장의 조직병리학적 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 췌장섬의 수 및 직경의 증가가 인정되었다(Fig. 6-8).

intact control (A,B), STZ control (C,D), silymarin 100 (E,F), GOS 800 (G,H), 400 (I,J) and 200 (K,L) mg/kg treated rats.

Note that marked atrophic changes on the pancreatic islets were detected in STZ control with decreases of pancreatic islet numbers in pancreatic parenchyma as compared with intact control. However, these atrophic changes of pancreas were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

PI : pancreatic islet

All H&E stain. Scale bars = 160 μm.

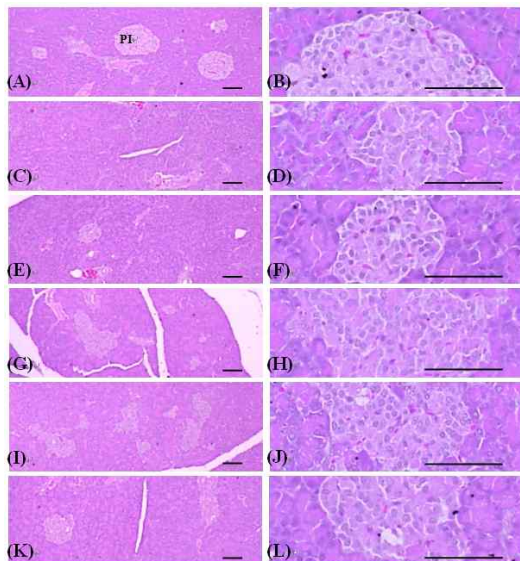


Fig. 6. Histopathological profiles of pancreas in

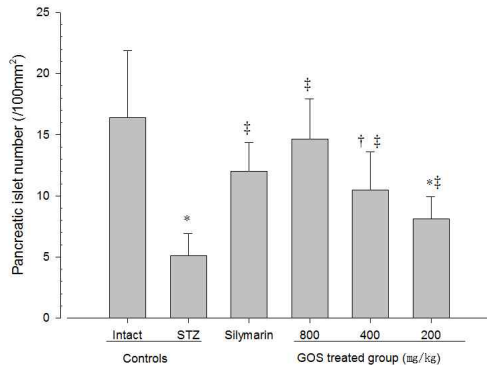


Fig. 7. Changes on the pancreatic islet numbers after STZ and test article administration.

Note that the marked and significant decreases of pancreatic islet numbers were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these pancreatic islet number decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  and † $p < 0.05$  as compared with intact control by MW test

‡ $p < 0.01$  as compared with STZ control by MW test

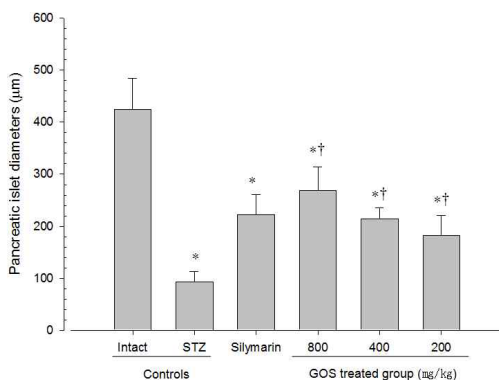


Fig. 8. Changes on the pancreatic islet diameters after STZ and test article administration.

Note that the marked and significant decreases of mean pancreatic islet diameters were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these pancreatic islet diameter decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

STZ control, respectively.

Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test

† $p < 0.01$  as compared with STZ control by LSD test

## 12. Insulin 면역반응세포의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) insulin 면역반응세포의 수적 증가가 관찰되었다(Fig. 9, 10).

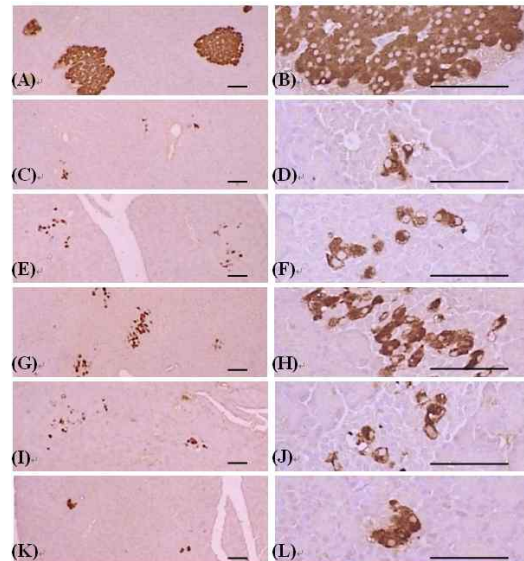


Fig. 9. Histopathological profiles of insulin-immunoreactive cells in the pancreas of intact control (A,B), STZ control (C,D), silymarin 100 (E,F), GOS 800 (G,H), 400 (I,J) and 200 (K,L) mg/kg treated rats.

Note that marked degranulation with decreases of insulin-immunoreactive cells in the pancreatic islets were detected in STZ control as compared with vehicle control. However, these decreases of insulin producing cells were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

All ABC methods, Scale bars = 160 µm.

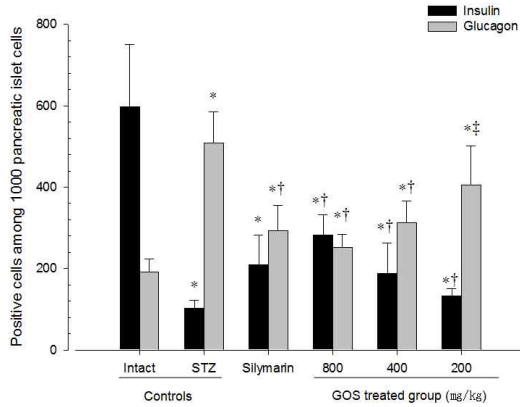


Fig. 10. Changes on the numbers of mean insulin- and glucagon-immunoreactive cells in the pancreatic islets after STZ and test article administration.

Note that significant decreases of insulin-immunoreactive cells with decreases of glucagon-immunoreactive cells were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these immunohistochemical changes were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by MW test

† $p < 0.01$  and ‡ $p < 0.05$  as compared with STZ control by MW test

### 13. Glucagon 면역반응세포의 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) glucagon 면역반응세포의 수적 감소가 관찰되었다 (Fig. 10, 11).

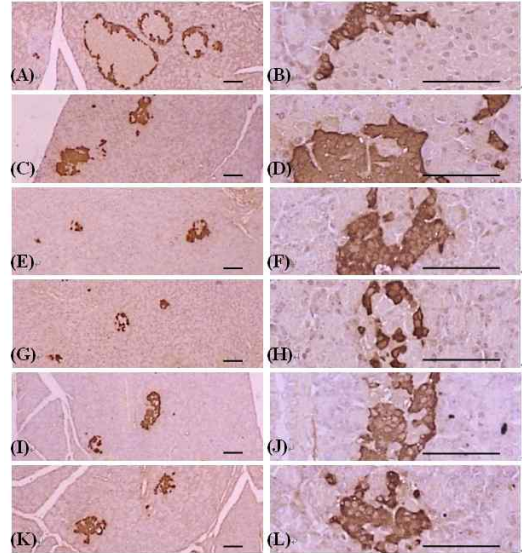


Fig. 11. Histopathological profiles of glucagon-immunoreactive cells in the pancreas of intact control (A,B), STZ control (C,D), silymarin 100 (E,F), GOS 800 (G,H), 400 (I,J) and 200 (K,L) mg/kg treated rats.

Note that marked disarrangements and increases of glucagon-immunoreactive cells in the pancreatic islets were detected in STZ control as compared with vehicle control. However, these increases of glucagon producing cells were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

All ABC methods, Scale bars = 160  $\mu$ m.

### 14. 신장의 조직병리학적 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 미만성 사구체 경화 및 세뇨관의 국소적 지방변성의 감소가 관찰되었다 (Fig. 12, 13).

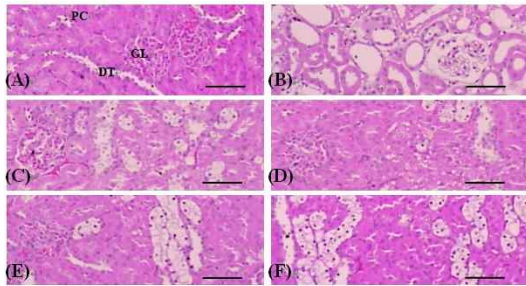


Fig. 12. Histopathological profiles of kidney in the intact control (A), STZ control(B), silymarin 100(C), GOS 800(D), 400(E) and 200(F) mg/kg treated rats.

Note that marked vasodilated atrophic changes of glomerulus and vacuolation (lipid droplet depositions) or severe atrophic changes of tubules were observed in the STZ control as compared with intact control. However, these histopathological changes of kidney were dramatically inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts  
 STZ : streptozotocin  
 GL : glomerulus  
 PT : proximal convoluted tubule  
 DT : distal convoluted tubule  
 All H&E stain, Scale bars = 160  $\mu$ m.

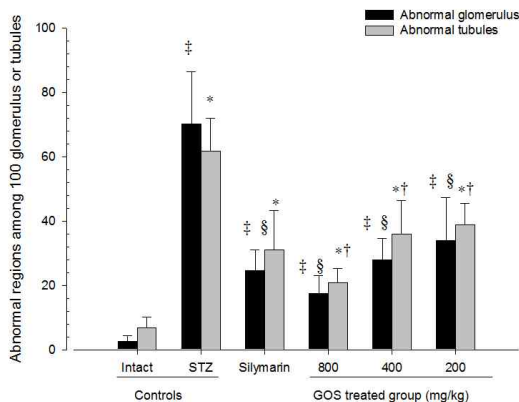


Fig. 13. Changes on the numbers of abnormal glomerulus and tubules in the kidney parenchyma after STZ and test article administration.

Note that significant increases of abnormal

glomerulus (vasodilated atrophy) and tubules (atrophy or vacuolation) were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these abnormal glomerulus and tubule increases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.

Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test

† $p < 0.01$  as compared with STZ control by LSD test

‡ $p < 0.01$  as compared with intact control by MW test

§ $p < 0.01$  as compared with STZ control by MW test

### 15. 가슴샘의 조직병리학적 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 가슴샘 피질 및 소엽 전체의 두께 증가가 관찰되었다(Fig. 14, 15).

### 16. 비장의 조직병리학적 변화

Silymarin, 加味五苓散 800, 400 및 200 투여군에서 각각 STZ 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 비장 두께, 백색 수질 수 및 백색 수질 평균 직경의 증가가 관찰되었다(Fig. 16-18).

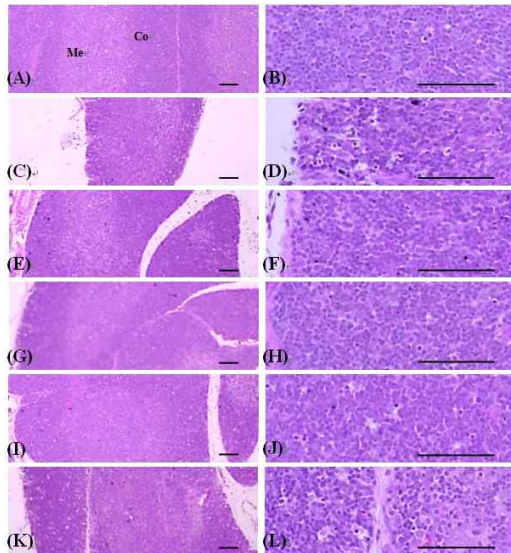


Fig. 14. Histopathological profiles of thymus in intact control (A,B), STZ control (C,D), silymarin 100 (E,F), GOS 800 (G,H), 400 (I,J) and 200 (K,L) mg/kg treated rats.

Note that marked atrophic changes on the thymic cortex were detected in STZ control as compared with intact control. However, these atrophic changes of thymic cortex were dramatically inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.  
 GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts  
 STZ : streptozotocin  
 Co : cortex  
 Me : medulla  
 All H&E stain. Scale bars = 160  $\mu$ m.

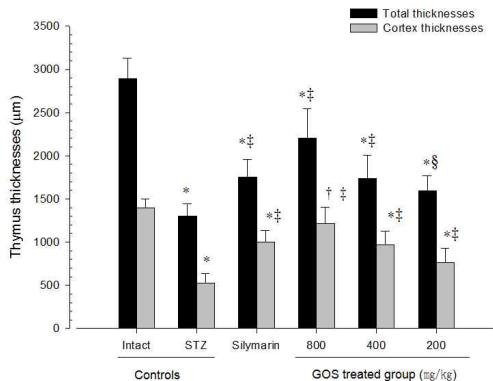


Fig. 15. Changes on the thymus total and cortex thicknesses after STZ and test article administration.

Note that significant decreases of thymus total and cortex thicknesses were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these thymus total and cortex thicknesses decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation of eight rats.  
 Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.  
 GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts  
 STZ : streptozotocin  
 \* $p < 0.01$  and † $p < 0.05$  as compared with intact control by LSD test  
 ‡ $p < 0.01$  and § $p < 0.05$  as compared with STZ control by LSD test

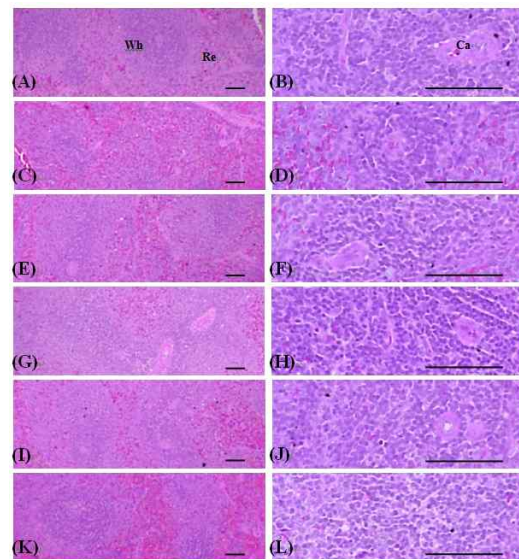


Fig. 16. Histopathological profiles of spleen in intact control (A,B), STZ control (C,D), silymarin 100 (E,F), GOS 800 (G,H), 400 (I,J) and 200 (K,L) mg/kg treated rats.

Note that marked atrophic changes of splenic white pulps were observed in STZ control as compared with vehicle control. However, these atrophic changes of splenic white pulp were dramatically inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively.  
 GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts  
 STZ : streptozotocin  
 Wh : white pulp  
 Re : red pulp  
 Ca : central arteriole  
 All H&E stain. Scale bars = 160  $\mu$ m.

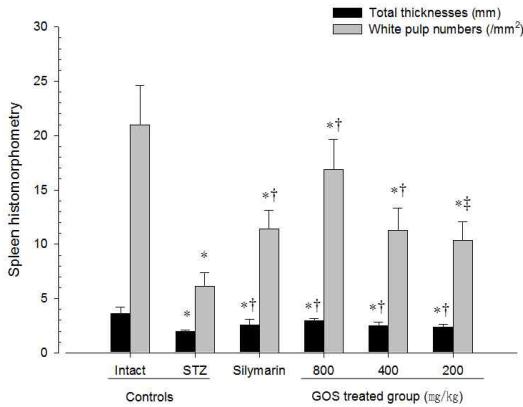


Fig. 17. Changes on the spleen total thicknesses and white pulp numbers after STZ and test article administration.

Note that significant decreases of spleen thicknesses and white pulp numbers were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these spleen thickness and white pulp decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats. Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts  
 STZ : streptozotocin  
 \* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test  
 † $p < 0.01$  and ‡ $p < 0.05$  as compared with STZ control by LSD test

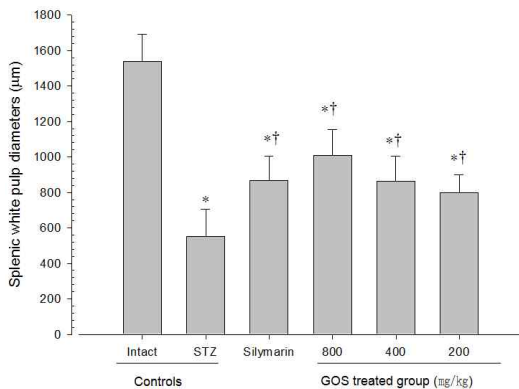


Fig. 18. Changes on the splenic white pulp thicknesses

after STZ and test article administration.

Note that the marked and significant decreases of mean splenic white pulp thicknesses were demonstrated in STZ control as compared with intact control. However, these splenic white pulp thickness decreases were significantly inhibited by treatment of silymarin, GOS 800, 400 and 200 mg/kg as compared with STZ control, respectively. Values are expressed mean ± standard deviation of eight rats.

Silymarin was dosed as 100 mg/kg of body weights.

GOS : *Gamioryung-san* aqueous extracts

STZ : streptozotocin

\* $p < 0.01$  as compared with intact control by LSD test

† $p < 0.01$  as compared with STZ control by LSD test

#### IV. 고찰

당뇨병의 병증은 한의학에서 消渴, 皮膚癢痒, 燥風痺, 痿, 二陽病, 癰疽, 眼昏, 痺痛 등의 범주에 속하며, 이 중 가장 근접한 병증은 消渴로, 여러 문헌에 나타난 消渴의 轉變症은 당뇨병의 만성 합병증에서 나타날 수 있는 증상들과 유사하다<sup>15</sup>. 한방적 기전을 보면 消渴은 陰虛燥熱로 시작하는데, 오래 되면 陰損及陽해서 陰陽兩虛나 陽虛 위주의 重病에 이르고, 아울러 흔히 감염이나 癰癤 등의 傳變證이 나타나 陰竭陽亡으로 위험한 상태에 이를 수 있다<sup>2</sup>.

당뇨병성 만성 합병증에는 대혈관 장애에 속하는 동맥경화증, 관상동맥질환 및 심근병증, 뇌혈관질환, 기타 말초혈관질환과 소혈관 장애에 속하는 망막병증, 신장병증, 신경병증, 당뇨병성 발병변이 있고 기타로 감염, 피부병변 등이 있다. 이 중 당뇨병성 신증은 다른 신장 질환 없이 당뇨병에 의해 신장이 손상된 것으로 소변 내 단백질의 증가를 확인함으로써 진단한다<sup>16</sup>.

당뇨병성 신증을 치료하기 위해서는 반드시 이러한 신장에서의 알부민 분비율(albumin excretion

rate)의 증가를 억제하거나 차단할 수 있어야 한다<sup>17</sup>. 당뇨병성 신증시 알부민뇨의 형성 기전은 아직 까지 정확히 밝혀져 있지 않으나, 당화 최종산물(advanced glycation end products), 국소적인 renin-angiotensin system의 활성화 또는 고혈당에 의한 사구체내 포도당의 축적 등이 거론되고 있으며, 산화 스트레스 또한 알부민뇨의 형성에도 밀접하게 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>117</sup>.

본 실험에서는 모델 흰쥐를 만들기 위해 streptozotocin (STZ)을 사용하였는데, STZ는 인슐린을 생산하는 췌장의 세포를 선택적으로 파괴시키는 약물로, 실험적 당뇨병을 유발시킨다. STZ는 췌장 세포를 파괴함과 동시에 free radical을 형성하여 oxidative stress에 의해 간과 신장 손상을 동시에 초래하여 당뇨병 다양한 당뇨병 합병증을 일으키며, 다른 췌장 세포 파괴 약물인 alloxan에 비해 비교적 독성이 약해, 인슐린종양과 같은 종양 치료에 사용해왔다<sup>5,18</sup>. STZ 유발 당뇨병 모델은 현재 가장 흔히 사용되는 당뇨병에 대한 실험동물 모델로 알려져 있으며, 다양한 당뇨병 및 당뇨병 합병증 치료를 위한 치료제 개발에 이용되고 있다<sup>19</sup>. 이 동물모델에서 일반적으로 혈당 농도의 변화와 같은 혈액생화학적인 변화, 췌장의 조직학적 변화, 췌장섬 내 insulin 및 glucagon 생산세포의 변화에 기초하여 항당뇨 효과를 검증해왔으며, 신장의 형태학적 변화, BUN 및 creatinine 함량, 알부민 분비율을 통해 당뇨병성 신증에 대한 효과를 검증해 왔고, 면역억제에 대한 효과 역시 각종 cytokine의 변화 및 비장과 가슴샘 같은 면역 장기의 형태학적 변화에 기초하여 평가해 왔다<sup>4,14,20</sup>.

본 실험에서 대조약물로 사용된 silymarin(milk thistle extracts)는 영경귀 추출물에서 유래된 flavonoid로, 강력한 항산화 효과를 가지고 있으며, 간세포를 위시한 신체의 세포에 대해 독소에 대한 강력한 보호 작용을 나타낸다<sup>21</sup>. 또한 silymarin은 강력한 항산화 작용으로 type 1 및 type 2 당뇨병 및 관련 합병증을 매우 효과적으로 예방 또는 치료하

는 것으로 알려져 있어, 현재 당뇨병 및 당뇨병 합병증 치료제 개발에 있어 가장 흔히 사용되는 대조 약물 중 하나이다<sup>22</sup>.

먼저 이전에 STZ로 유발된 당뇨병성 신증에 대하여 실험연구된 논문들을 살펴보면, 丹蔘은 단백뇨 배출을 감소시키고 조직학적 변화를 억제하나 혈당의 조절에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었고<sup>23</sup>, 石膏의 경우에도 뇨중 단백질 배출량 증가 억제되고 혈중 BUN, creatinine 감소시키고 조직학적 변화를 억제하나 혈중 glucose의 증가와 albumin농도 감소에는 유의한 차이를 내지 못하였고 혈청 albumin농도는 생리식염수 대조군에 비해 감소되어 있어 추후 실험이 필요한 것으로 나타났다<sup>24</sup>. 水蛭은 요단백배설량을 개선시키고 조직학적 검사에서 유효한 결과를 얻었으나 혈청 glucose증가, albumin감소, BUN, creatinine증가에는 유의한 변화가 보이지 않았다<sup>25</sup>. 薏苡仁 추출물은 혈청 creatinine수치는 유의하게 감소시키나, 혈청 BUN과 뇨중 glucose에는 영향을 미치지 못하는 것으로 보고 되었다<sup>26</sup>. 蔘芪地黃湯加淫羊藿은 혈당과 혈청 중 creatinine 수치는 감소시켰으나, 뇨중 glucose의 저하나 신장피질조직 내 과산화지질 함량 변화에는 영향을 미치지 못했다<sup>27</sup>. 蔘芪地黃湯加丹蔘,大黃,紅花는 혈청 creatinine수치의 감소, 뇨중 albumin 배설증가 억제 효과가 있었으나 혈당감소에는 영향을 주지 못했고 혈청 BUN 수치와 과산화물 생성을 억제하는 경향을 가지긴 하였으나 유의성은 없었다<sup>28</sup>. 신 등<sup>29</sup>의 한약복합처방은 혈중 creatinine 함량은 유의하게 감소시키나 BUN함량에는 특별한 영향을 미치지 않았다. 나 등<sup>30</sup>의 당뇨1호방의 약침 및 경구투여에서도 혈청 creatinine과 BUN, 뇨중 albumin 배설량은 유의하게 감소시켰으나 뇨중 glucose의 변화나 신장피질조직 내 과산화지질, GSH활성에는 유의한 변화가 보이지 않았다.

본 실험에서 사용한 加味五苓散은 猪苓, 澤瀉, 白朮, 茯苓 및 肉桂의 五苓散에 補氣升陽, 固表止汗, 托毒排膿하는 효능이 있는 黃芪, 益腎固精하는



효능이 있는 蓮子肉, 暖腎의 효능이 있는 益智仁, 利水通淋滲濕止瀉하는 車前子, 益肺腎의 효능이 있는 山藥, 益腎固精 및 縮尿止濁하는 桑螵蛸, 斂肺滋腎의 효능이 있는 五味子, 溫裏祛寒하여 腎陽을 補하는 작용이 뛰어난 肉桂를 가미하였다<sup>31</sup>. 이 처방은 대구한의대 신계내과에서 임상에서 陽虛水泛으로 변증되는 만성 小便不利, 尿濁, 浮腫 등 증에 적용되었으며 당뇨병성 신증에도 유효한 효과가 기대된다.

본 실험에서 STZ 투여에 의해 현저한 체중의 감소, 혈당의 증가와 동시에 췌장에서 췌장섬의 위축과 insulin 생산세포의 감소 및 glucagon 생산세포의 증가가 면역조직화학적으로 관찰되어, 이전의 보고들<sup>14</sup>과 유사하게 췌장의 세포의 파괴에 의한 당뇨병이 유발되었다. 이와 함께 신장 중량, 요량, 요중 알부민 분비율, 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가와 함께, 신장의 조직병리학적 검사에서 미만성 사구체 경화와 세뇨관 변성이 이전의 보고들<sup>20</sup>과 같이 관찰되었다. 또한 신장 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소가 SOD 및 CAT 활성의 감소와 함께 관찰되어 이전의 보고들<sup>5,18</sup>과 같이 항산화 활성의 억제에 의해 당뇨병 및 당뇨병성 신증이 초래된 것으로 보인다. 또한 가슴샘 및 비장 장기 중량의 감소가 조직병리학적 위축 소견과 함께 관찰되어, 면역억제 역시 이전의 보고들<sup>4</sup>과 유사하게 당뇨병 및 당뇨병성 신증의 유발에 관여하는 것으로 판단되었다.

한편 加味五苓散 800 및 400 투여군에서는 加味五苓散 투여 14일부터, 加味五苓散 200 투여군에서는 투여 27일 후부터 STZ 대조군에 비해 유의성있는 체중과 증체량의 증가가 관찰되었다. 당뇨병의 진행과 함께 초래되는 체중 감소는 STZ 유발 Type I 당뇨병 및 이와 관련된 합병증에 의해 유발되는 이차적인 변화로, 따라서 본 실험 결과 인정된 加味五苓散 투여에 의한 투여 용량 의존적인 체중 감소 억제는 加味五苓散의 STZ 투여로 유발된 당뇨병 및 이와 관련된 합병증에 대한 유효한

효과를 간접적으로 나타내는 증거로 생각된다. 단, 일반적으로 면역활성 효과가 있는 물질 투여시 체중의 증가 등 성장 촉진 효과가 인정되는 것으로 알려져 있어<sup>32</sup>, 면역활성 등의 다른 약리작용에 수반된 이차적 변화일 가능성 역시 배제할 수 없다. 본 실험의 결과, 加味五苓散 400 mg/kg은 100 mg/kg의 silymarin 투여군과 유사한 체중 감소 억제 효과를 나타내었다.

또 혈당의 변화를 보았을 때, 세 용량의 모든 加味五苓散 추출물 투여군에서 STZ 대조군에 비해 유의하게 용량 의존적으로 혈당 감소가 관찰되었다. 고혈당증은 당뇨병의 가장 기본적인 증상으로 당뇨병을 치료하기 위해서는 반드시 조절되어야 한다. 따라서 본 실험의 결과는 加味五苓散의 당뇨병에 대한 치료효과를 직접적으로 나타내는 증거로 판단된다. 본 실험에서 인정된 加味五苓散의 혈당강하 효과는 구성 약제 자체 또는 상호 작용에 의한 것으로 판단되며, 加味五苓散 400 mg/kg은 100 mg/kg의 silymarin 투여군과 유사한 혈당강하 효과를 나타내었다.

신장의 변화를 보면, STZ 투여로 나타난 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가, 미만성 사구체 경화 및 세뇨관의 국소적 지방변성 증가가 모든 용량의 加味五苓散 투여군에서 투여 용량 의존적으로 억제되었다. 혈중 BUN 및 creatinine 함량, 신장 중량 증가 및 조직병리학적 변화의 억제는 당뇨병성 신증에 대한 약물의 효과를 직접적으로 보여 주는 증거로 사용되어 왔다<sup>33</sup>. 이 중 BUN은 단백질 분해산물인 요소질소의 혈중 함량을 측정하는 것으로, 혈중 BUN의 상승은 일반적으로 신장 질환의 존재를 의미하고, creatinine 역시 근육의 비단백질성 질소 산물로 creatinine 혈중 증가는 사구체 여과율의 감소와 같은 신장 질환을 의미한다<sup>34</sup>. 加味五苓散 추출물은 당뇨병성 신증을 매우 유효하게 억제하는 것으로 판단되며, 加味五苓散 400 mg/kg은 100 mg/kg silymarin과 유사한 당뇨병성 신증에 대한 효과를 나타내었다.

신장 내 항산화 방어 system의 변화를 보면, STZ 투여 후 유발된 조직 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소, SOD 및 CAT 활성의 감소가 세 용량의 모든 加味五 散 물 추출물 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 최근의 연구에 따르면, 당뇨병 및 당뇨병성 신증의 유발에 free radical에 의한 항산화 방어기전의 변화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고<sup>1,5,6</sup>, 특히 산화 스트레스의 증가는 당뇨병시 더 많은 free radical을 형성하고, 이렇게 형성된 free radical 들은 당뇨병 합병증의 원인이 된다<sup>18</sup>. 따라서 본 실험의 결과는 加味五 散 물 추출물의 STZ 유발 당뇨병 및 당뇨병성 신증에 대한 효과가 항산화 효과에 의해 초래되는 것으로 생각할 수 있다. 한편 加味五 散 400 mg/kg은 100 mg/kg silymarin 과 유사한 항산화 활성을 나타내었다.

가슴샘과 비장의 변화를 보면, STZ투여 후 발생한 가슴샘 및 비장 중량의 감소와 조직병리학적으로 위축이 加味五 散 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 억제되었다. 당뇨병 시 나타나는 면역억제와 이로 인한 이차 감염은 중요한 당뇨병 합병증의 하나로 취급되고 있으며, 면역활성 물질의 투여에 의해 당뇨병성 신증과 같은 합병증이 완화되는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>. 본 실험의 결과로 볼 때 加味五 散은 당뇨병과 관련된 면역억제에 대하여 유효하게 면역활성 효과가 있는 것으로 판단되며, 당뇨병과 신장손상을 나타내 주는 모든 지표가 유의하게 감소한 점이 특별히 주목할 만하다. 한편 加味五 散 400 mg/kg은 100 mg/kg silymarin과 유사한 면역활성 효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 加味五 散 400 mg/kg은 100 mg/kg의 silymarin 투여군과 유사한 정도로 항산화, 혈당감소 및 면역조절을 통해 당뇨병 및 당뇨병성 신증에 매우 유효한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

## V. 결 론

加味五 散이 당뇨병성 신증에 대한 나타내는 효과를 평가하기 위하여 STZ 유발 당뇨병 흰쥐 모델을 이용하여 연구 평가하였다.

1. 加味五 散 투여는 당뇨병 흰쥐의 체중감소, 신장중량의 증가, 가슴샘과 비장중량의 감소를 각각 억제하였다.
2. 加味五 散 투여는 당뇨병 흰쥐의 혈당과 혈중 BUN, creatinine 및 요량 및 요중 알부민 분비율의 증가를 각각 억제하였다.
3. 加味五 散 투여는 당뇨병 흰쥐의 신장 내 MDA 함량 증가, GSH함량 감소, SOD 및 CAT 활성의 감소를 각각 억제하였다.
4. 加味五 散 투여는 당뇨병 흰쥐 췌장의 췌장섬수 및 직경의 감소, insulin면역반응세포의 수적 감소, glucagon면역반응세포의 수적 증가를 각각 억제하였다.
5. 加味五 散 투여는 당뇨병 흰쥐 신장의 미만성 사구체 경화 및 세뇨관의 국소적 지방변성 증가를 각각 억제하였다.
6. 加味五 散 투여는 당뇨병 흰쥐 가슴샘의 가슴샘 피질 및 소엽전체 두께의 감소, 비장의 두께, 백색 수질 수 및 백색 수질 평균 직경의 감소를 각각 억제하였다.

이상의 결과는 모두 용량 의존적 유효성이 인정되었으며, 加味五 散은 항산화, 혈당감소 및 면역조절을 통해 당뇨병 및 당뇨병성 신증에 매우 유효한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

## 참고문헌

1. 박정탁, 강식욱. 당뇨병성 신증의 병태생리. 대한내과학회지 2009;77(6):670-7.

2. 전국 한의과대학 신계내과학교실. 신계내과학. 서울: 군자출판사; 2011. p. 95, 310-2.
3. Fujii H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, et al. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Am J Nephrol* 2010;31:342-5.
4. Briede J, Stivrina M, Stoldere D, Vigante B, Duburs G. Effect of cerebropast on body and organ weight, food and water intake, and urine output of normal rats. *Cell Biochem Funct* 2008;26:908-15.
5. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet Med* 1992;9:297-9.
6. Bolling BW, Chen CY, Blumberg JB. Tea and health: preventive and therapeutic usefulness in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:42-8.
7. Vessal G, Akmal M, Najafi P, Moein MR, Sagheb MM. Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail* 2010;32:733-9.
8. Kavutcu M, Canbolat O, Oztrk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekin C, et al. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. *Nephron* 1996;72:269-74.
9. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
10. Draper HH, Hadley M. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1990, p. 421.
11. Eyer P, Podhradsk D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1986;153:57-6.
12. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276-8.
13. Sternberger LA. The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: Sternberger LA, ed. *Immunocytochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1979, p. 104-6.
14. Kim JD, Kang SM, Park MY, Jung TY, Choi HY, Ku SK. Ameliorative anti-diabetic activity of dangnyosoko, a Chinese herbal medicine, in diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:1527-3.
15. 장태수, 정해철, 류봉하. 증상을 중심으로 본消渴과 糖尿病의 관계. 대한한방내과학회지 1985;2:61-9.
16. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울: 정보사; 2003, p. 514-7.
17. Osicka TM, Yu Y, Panagiotopoulos S, Clavant SP, Kiriazis Z, Pike RN, et al. Prevention of albuminuria by aminoguanidine or ramipril in streptozotocin-induced diabetic rats is associated with the normalization of glomerular protein kinase C. *Diabetes* 2000;49:87-9.
18. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-6.
19. Quine SD, Raghu PS. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol Rep* 2005;57:610-5.
20. Anjaneyulu M, Chopra K. Diltiazem attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Ren Fail* 2005;27:335-4.
21. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of

- hepatic disorders. *Bio Drugs* 2001;15:465-89.
22. Huseini HF, Larijani B, Heshmat R, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, et al. The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytother Res* 2006;20:1036-9.
  23. 김영석, 이병철, 안세영, 두호경, 안영민. 丹蔘이 당뇨병성 신병증 Rat의 신기능 및 조직학적 변화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008; 29(3):787-99.
  24. 홍광해, 이권호, 정기훈, 김용성, 이현주. 石膏가 streptozotocin으로 유발된 rat의 糖尿病性 腎症에 미치는 影響. 대한한방내과학회지 2008;29(4):1025-36.
  25. 서수환, 김용성, 한양희. 水蛭이 Streptozotocin으로 유발된 Rat의 糖尿病性 腎症에 미치는 影響. 대한한의학회지 2008;29(4):133-45.
  26. 조수인, 김형우, 김정상. 薏苡仁 추출물의 경구 투여가 Streptozotocin에 의한 흰쥐의 당뇨병성 신증에 미치는 영향. 대한본초학회지 2006;21(3):75-81.
  27. 윤관희, 김용성. 蔘芪地黃湯加淫羊藿이 Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 糖尿病性 腎症에 미치는 영향. 대한한의학회지 2006;27(1):47-56.
  28. 조현주, 김용성. 蔘芪地黃湯加丹蔘, 大黃, 紅花 가 Streptozotocin으로 유발된 생쥐의 糖尿病性 腎症에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2005; 26(4):767-75.
  29. 신현권, 류충열. 韓藥複合處方이 Streptozotocin으로 유발된 糖尿病 흰쥐의 혈당 및 糖尿病性 腎症 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지 2008; 25(3):115-2.
  30. 나건호, 조수인, 조명래. 糖尿1號方의 藥鍼 및 口腔投與가 Streptozotocin에 의한 흰쥐의 糖尿病性 腎症에 미치는 영향. 대한침구학회지 2005; 22(5):1-10.
  31. 한방약리학교재편찬위원회 저. 한방약리학. 서울: 신일상사; 2010, p. 126-30, 315-21, 519-22, 746-9, 751-5, 769-73, 790-6.
  32. Pinzone Fox, ML, Sastry MK, Parenti DM, Simon, GL. Plasma leptin concentration increases early during highly active antiretroviral therapy for acquired immunodeficiency syndrome, independent of body weight. *J Endocrinol Invest* 2005;28:1-3.
  33. Montilla P, Barcos M, Munoz MC, Bujalance I, Munoz-Castaneda JR, Tunez I. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:539-44.
  34. Sodikoff CH. Laboratory profiles of small animal diseases. A guide to laboratory diagnosis. 2nd ed. St. Louise: Mosby; 1995, p. 1-36.