

## 제2형 당뇨 마우스에서 十棗湯에 의한 혈당 및 신기능 부전 개선효과

윤정주<sup>1,2,3#</sup>, 이윤정<sup>1,2,3</sup>, 김혜음<sup>1,2,3</sup>, 안유미<sup>1,2,3</sup>, 김현준<sup>1,2,3</sup>, 홍미현<sup>1,2,3</sup>,  
황진석<sup>1,2</sup>, 이호섭<sup>1,2,3</sup>, 강대길<sup>1,2,3\*</sup>

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 원광대학교 한의학전문대학원, 3 : 원광대학교 한방체액조절연구센터

### Improvement Effect of Sibjotang on Blood Glucose and Renal Dysfunction in Type II Diabetic Mice

Jung Joo Yoon<sup>1,2,3#</sup>, Yun Jung Lee<sup>1,2,3</sup>, Hye Yoom Kim<sup>1,2,3</sup>, You Mee Ahn<sup>1,2,3</sup>, Xian Jun Jin<sup>1,2,3</sup>,  
Mi Hyeon Hong<sup>1,2,3</sup>, Jin Seok Hwang<sup>1,2</sup>, Ho Sub Lee<sup>1,2,3</sup>, Dae Gill Kang<sup>1,2,3\*</sup>

1 : Department of Physiology, College of Korean Medicine, 2 : Professional Graduate School of Korean Medicine,  
3 : Hanbang Body-fluid research center, Wonkwang University

#### ABSTRACT

**Objectives** : It is well known that Sibjotang (Shizaotang), traditional herbal medicine formula, regulates the body fluid blood pressure homeostasis. This study is to investigate whether Sibjotang improves diabetic renal dysfunction in type II diabetes mellitus animal model, db/db mice.

**Methods** : The animals model were divided into three groups at the age of 8 weeks; control group (C57BLKS/J-db/mice), diabetic group [(C57BLKS/J+Lepr)-db/db mice], and Sibjotang group [(C57BLKS/J+Lepr)-db/db mice + Sibjotang 100 mg/kg/day]. During 8 weeks of treatment, blood glucose and urinary albumin excretion were checked in metabolic chamber at 8, 12, and 16 weeks of age, respectively.

**Results** : Body weight and food intake of diabetic group were significantly higher than control group after 8 weeks administration. However, there were not significant different between the diabetic group and Sibjotang group. Urinary albumin excretion was significantly decreased in the Sibjotang group than the diabetic group. In addition, supplementation with Sibjotang significantly lowered levels of blood glucose, insulin, and homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR), suggesting reduced insulin resistance. The ratio of mesangial matrix/glomerular area was markedly larger in diabetic group than control group, whereas Sibjotang significantly reduced this expansion. Moreover, immunohistological study revealed that Sibjotang attenuated the increase of transforming growth factor(TGF)- $\beta$  expression in kidney.

**Conclusion** : Sibjotang ameliorates diabetes-associated renal injury through the improvement of the blood glucose and insulin sensitivity, and inhibiting the TGF- $\beta$  1 expression. Therefore, Sibjotang may be a new therapeutic formula for the treatment of diabetic-associated renal dysfunction.

**Key words** : Sibjotang, db/db mice, Blood glucose, TGF- $\beta$ 1

## I. 서 론

당뇨병은 발병 원인에 따라 제1형 당뇨와 제2형 당뇨로 구분되며, 인슐린과 글루카곤과 같은 당질의 대사에 관여하는

\*Corresponding author : Dae Gill Kang, College of Korean Medicine, Wonkwang University.

· Tel : +82-63-850-6933 · Fax : +82-63-850-7260 · E-mail : dgkang@wku.ac.kr

#First author : Jung Joo Yoon, College of Korean Medicine, Wonkwang University.

· Tel : +82-63-850-6447 · Fax : +82-63-850-7260 · E-mail : morality16@hanmail.net

· Received : 27 October 2016 · Revised : 30 November 2016 · Accepted : 15 January 2017

호르몬의 이상이나 작용경로의 비정상적 반응으로 당질대사 장애가 초래되어 고혈당을 나타내는 질환이다<sup>1)</sup>. 특히, 제 2형 당뇨의 경우 인슐린 저항성으로 인해 혈중 당의 농도가 높게 지속되어 주요 장기를 손상하게 한다. 대표적으로 당뇨병이 지속되면 신장의 혈관들이 손상을 받게 되고 이로 인해 신장의 주기능인 여과에 영향을 미쳐 신장 기능 장애를 유발하게 된다. 고혈당에 의한 신기능 장애를 당뇨병성 신증이라 하며 이는 당뇨병의 가장 중한 만성합병증 중 하나로 말기 신부전을 초래하는 가장 흔한 원인 질환이다<sup>2,3)</sup>. 당뇨병성 신장 손상은 병리학적으로 사구체 비대, 세포외기질의 축적, 메산지움의 과증식 등이 관찰되며 이로 인해 기저막이 두꺼워지고 소변으로 단백질이 다량 배출되는 등의 증상을 초래한다<sup>4,5)</sup>.

다양한 합병증을 유발하는 당뇨병의 치료로는 경구용 혈당 강하제를 사용하거나 식이 조절을 통한 혈당을 조절하는 방법을 주로 사용하고 있다. 그러나 이러한 약물들은 간 기능 손상, 복부지방 증가 등의 부작용을 초래할 수 있으며, 장기간 사용했을 경우 내성으로 인한 혈당 조절 효과가 낮아질 수 있다<sup>6,7)</sup>. 이에 부작용이 비교적 적은 천연물을 이용한 당뇨 치료 활성 물질을 찾으려는 연구가 최근 많이 진행되어 지고 있다. 이에 우리는 이미 오래전부터 임상에서 사용되어 온 복방인 십조탕을 이용하여 당뇨병성 신장 손상에 대한 연구를 진행하였다.

제2형 당뇨병 모델인 C57BLKS/J-db/db 마우스는 시상하부에 위치한 비만 유전자 (leptin) 수용체의 돌연변이로 인해 leptin 신호전달과정에 결함이 생겨 고혈당, 고-인슐린혈증, 과도한 먹이 섭취, 지방 축적, 고-렙틴혈증, 등 다양한 대사적 이상을 특징으로 하는 동물모델로 당뇨병 및 인슐린저항성에 대한 연구에 이용되는 대표적인 동물 모델이다<sup>8,9)</sup>. 특히, 제2형 당뇨 환자의 유형과 가장 유사한 것으로 알려져 있어<sup>10)</sup> 최근 제2형 당뇨 및 그 합병증의 개선에 대한 천연물의 효과에 대해 많은 연구가 진행되고 있다.

십조탕(十棗湯)은 원화(芫花), 감수(甘遂), 대극(大戟), 그리고 대조(大棗)의 4가지 약재로 구성된 복합 처방으로 장중경(張仲景)의 [상한론(傷寒論)] 에 처음 기록 되어 있다. 전신의 부종과 복부 팽만 등에 주치로 사용되며, 체액의 항상성 조절에 관련된 질환을 치료하는 약으로 오랫동안 알려져 있다<sup>11)</sup>. 십조탕의 구성약재 중 가장 많은 비중을 차지하는 대조 즉, 대추(*Zizyphus jujuba* MILLER)는 노화 방지, 뇌출혈, 고혈압 등에 약리 효과를 가지는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 그 성분으로는 30여 종의 alkaloids, saponin, triterpenoid, 그리고 polyphenol 등이 함유되어 있으며 진통, 항균, 해열, 면역증강, 항산화, 항염증 등의 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>13-15)</sup>. 이전에 십조탕에 대한 연구로는 박동 관류 심방모형에서의 심방이노호르몬(ANP)의 분비를 증가시켜 체액 및 순환계의 항상성 조절에 영향을 미친다는 내용이 있으나<sup>11)</sup> 당뇨 혹은 당뇨병성 신장 손상과 관련된 연구는 진행된 적이 없었다.

따라서 본 연구에서는 db/db 마우스를 이용한 제 2형 당뇨 모델에서의 십조탕 물추출물 투여에 따른 당뇨병성 신장 손상 개선에 대해 조사하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 제조

십조탕(197.5 g)은 전탕 추출법을 이용하여 제조하였다. 甘遂(*Euphorbia kansui*, 37.5 g), 大戟(*Euphorbia pekinensis*, 37.5 g), 芫花(*Daphne genkwa*, 37.5 g), 그리고 大棗(*Zizyphus jujuba*, 85 g)는 건조된 것을 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 증류수 2,000 mL가 들어있는 냉각기가 설치된 삼각플라스크에 넣은 후 120 분간 가열하였다. 십조탕 추출액을 3,000 rpm으로 30 분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 회전식 증발기로 감압 농축한 후 동결 건조하여 십조탕 추출물(HBG-132) 44 g (수득율 22.28%)의 분말을 얻었다.

### 2. 실험동물 및 식이

실험은 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻어 시행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다. 7주령의 수컷 db/m 마우스(C57BLKS/J)와 db/db 마우스(C57BLKS/J-Lepr<sup>db</sup>)를 central Lab. (Seoul, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 8주령이 되었을 때 다음과 같이 10 마리씩 3개 그룹으로 무작위로 구분하였다. 1군 : 정상군 (db/m 마우스), 2군 : 당뇨유발군 (db/db 마우스), 3군 : 십조탕 투여군 (db/db 마우스, 십조탕, 100 mg/kg/day). 실험기간 동안 식이와 식수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 체중, 식이 및 음료 섭취량은 매주 측정하였으며, 혈당, 소변량, 삼투압 및 전해질량은 4주에 한번 측정하였다. 사육실의 온도 및 습도는 각각 22 ± 2°C 및 50~60%로 유지 하였으며, 12시간 간격으로 점등 및 소등 하였다.

### 3. 혈당의 측정

혈당은 마우스의 꼬리정맥의 전혈에서 Onetouch® Ultra™ Blood glucose Meter 및 Test Strip (Life Scan Inc., CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 측정값은 Onetouch® Ultra™ Blood glucose Meter의 수치를 mg/dL로 나타내었다.

### 4. 콜레스테롤 및 지질 함량 측정

혈장은 3,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하고, 분석 장비로서 Hitachi 7080(Hitachi, Japan)을 사용하였다. 혈장 지질수치와 생화학적 수치는 8주 동안 투여한 후 공복 시 혈장으로 마지막 주에 분석하였다. 마우스 혈장에 대하여 serum total cholesterol (T-protein), total cholesterol (T-Cho), triglyceride (TG), low-density lipoproteins (LDL-c), high-density lipoproteins (HDL-c)의 혈액생화학적 수치를 측정하였다.

### 5. 인슐린 저항성 측정

인슐린저항성의 지표로서 HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of insulin resistance index)를 이용하였으며,

그 계산 방법은 아래와 같다<sup>16)</sup>.

$$\begin{aligned} *HOMA-IR &= \frac{\text{Fasting serum insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Fasting blood glucose (mmol/L)}}{22.5} \\ &= \frac{\text{Fasting serum insulin (ng/mL)} \times \text{Fasting blood glucose (mg/dL)}}{405} \end{aligned}$$

## 6. PAS 염색

적출된 신장 조직을 10% 포르말린 (pH 7.4)에 3 일 고정시킨 후, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 50% 알코올에서부터 100% 알코올까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기 (Microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 3  $\mu\text{m}$ 으로 자른 뒤 슬라이드 위에 부착 시켜 절편을 만들고 이를 periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다 (BX41, Olympus, Japan).

## 7. Immunohistochemistry 염색

적출된 신장 조직을 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4°C에서 5 시간 고정하고, 30% sucrose 용액에 조직을 침적시켰다. 조직을 OCT compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance)에 넣고 영하 20°C에서 동결한 후 cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA)를 이용하여 4  $\mu\text{m}$ 의 두께로 평행하게 횡단절편을 만든 후 poly-L-lysine 용액으로 코팅한 슬라이드글라스 위에 부착시켰다. 실온에서 하룻밤 충분히 건조시킨 다음 영하 70°C에서 보관하였다. HISTO-STAIN<sup>®</sup>-SP Kits (Invitrogen Inc, USA)를 사용하여 [strept]Avidine-biotin 방법을 이용하여 염색을 진행하였다. 절편이 붙어 있는 슬라이드를 실온에 1 시간 정도 건조시킨 후 PBS로 3번 세척한 후 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 넣어 1 분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 PBS로 3번 세척한 다음 10% non-immune goat serum을 사용하여 20 분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. Blocking antibody를 제거한 뒤 Transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 에 결합하는 mouse monoclonal IgG (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology, USA)을 습윤 상자에 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 슬라이드를 세척한 다음 이차항체인 biotinylated secondary antibody에 20 분 동안 실온에서 반응시킨 후 PBS로 5 분씩 세 번 세척하였다. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin에 30 분 동안 반응시킨 후 PBS로 세 번 세척하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) chromogen과 hWMAtoxylin (zymed, CA, USA)을 이용하여 일정시간 동안

발색시킨 다음 슬라이드를 흐르는 물에 씻어 반응을 중지시킨 후 봉입제로 봉입하였다. 각각의 발현 정도는 광학현미경으로 200배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다 (BX41, Olympus, Japan).

## 8. 통계처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 SigmaPlot 10.0 프로그램을 이용하여 Students t-test 나 one-way ANOVA test를 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

# Ⅲ. 결 과

## 1. 체중변화, 식이 및 수분 섭취량

8주 동안의 전 실험기간 동안 db/m 군과 비교했을 때 db/db 군 모두에서 당뇨병증상과 관련된 다뇨 및 다갈 증세를 보였다. 십조탕 추출물 투여기간 동안의 체중의 변화를 살펴 보기 위해 매주 체중을 측정하였다. 그 결과, 정상군인 db/m 군과 비교 했을 때, 당뇨병군인 db/db 군에서 체중이 유의하게 증가된 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 실험 기간 동안의 식이 섭취량에서도 유사한 결과를 나타내었다. 그러나, db/db 군 간의 식이섭취량은 유의한 차이를 보이지 않았으며, 따라서 십조탕 투여는 체중의 증감에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료 된다 (Figure 1). 반면, 약물 투여 8주 동안의 음료 섭취량은 당뇨가 유발된 군에서 크게 증가함을 보였고 십조탕을 투여한 군에서 유의하게 감소되는 경향을 보였다 (Figure 1, P<0.01). 또한, 실험 종료 후, 각 군의 body type 및 waist line 이 당뇨군에 비해 십조탕 투여 군에서 현저하게 감소된 것으로 볼 수 있었다 (Figure 1).

## 2. 혈장 내 콜레스테롤 및 지질 대사에 미치는 영향

혈중 지질 프로파일은 당뇨병치료의 중요한 바이오 마커인 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 따라서 본 연구에서 십조탕 물 추출물의 투여가 혈중 지질 함량 변화에 미치는 영향을 측정하였다. 혈중의 T-protein, T-Bilirubin, T-Cho, TG (중성지질), BUN, 그리고 LDL-c 함량이 일반군 (db/m)에 비해 당뇨군 (db/db)에서 유의적인 증가를 나타냈다 (Table 1,

P<0.01). 중성지방과 담즙정체의 지표인 T-Bilirubin의 혈중 함량은 당뇨군(140.41±2.63, 2.10±0.16)에 비해 십조탕 투여군에서 각각 115.75±5.20 (P<0.01)과 1.51±0.26

(P<0.05)으로 유의하게 감소하였다 (Table 1). 그러나 혈중의 HDL-c의 함량 변화는 모든 군에서 차이가 나타나지 않았다.

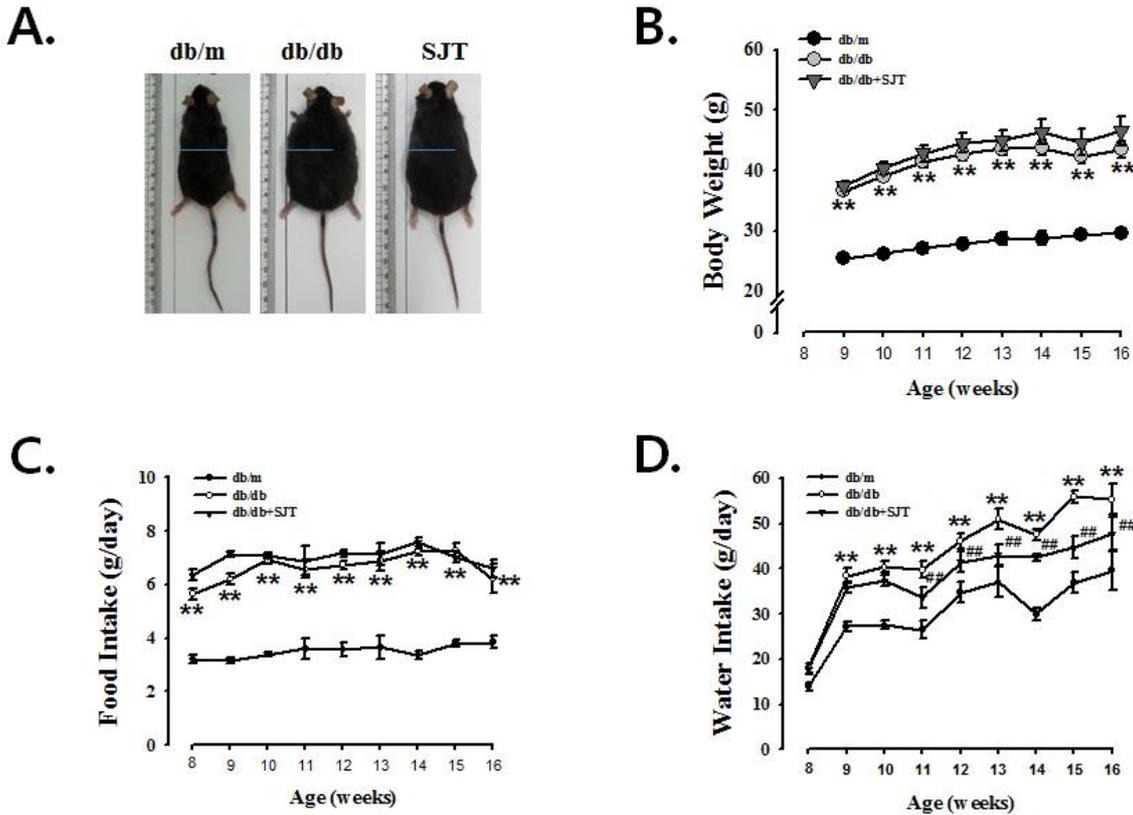


Figure 1. Changes in (A) Body type/Waist line level, (B) Body weight, (C) Food intake, and (D) Water intake in non-diabetic db/m and diabetic db/db mice treated with or without Sibjotang for 2 months starting at age of 8 weeks. Data are shown as means ± S.E. \*\*P<0.01 vs. db/m mice; ##P<0.01 vs. db/db mice.

Table 1. Effect of Sibjotang on lipid profiles in diabetic db/db mice.

|                     | db/m       | db/db          | db/db + SJT   |
|---------------------|------------|----------------|---------------|
| T-protein (g/dl)    | 5.08±0.12  | 5.87±0.14**    | 5.54±0.14     |
| T-Bilirubin (mg/dl) | 1.12±0.12  | 2.10±0.16**    | 1.51±0.26#    |
| T-Cho (mg/dl)       | 62.75±4.81 | 121.83±12.61** | 97.38±16.50   |
| TG (mg/dl)          | 62.83±1.53 | 140.41±2.63**  | 115.75±5.20## |
| BUN (mg/dl)         | 18.36±4.81 | 22.63±0.88**   | 22.25±1.16    |
| LDL-c (mg/dl)       | 17.30±3.35 | 50.61±7.52**   | 43.13±11.39   |
| HDL-c (mg/dl)       | 53.44±2.69 | 53.00±3.89     | 54.25±5.36    |

\*T-protein, total protein; T-Cho, total cholesterol; TG, triglyceride; BUN, blood urea nitrogen; LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-c, High-density lipoprotein-cholesterol. Values are expressed as mean ± S.E. \*\*P<0.01 vs. db/m mice; #P<0.05, ##P<0.01 vs. db/db mice.

### 3. 신장 기능 개선에 미치는 영향

십조탕이 신장 기능 개선에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 약물 투여 0, 4, 8주에 24시간 뇨를 모아 뇨 중 알부민 배설량을 측정하였다. 그 결과, 실험 기간 동안 당뇨군에서 정상군에 비해 유의한 증가를 보였으며, 십조탕을 투여한 군

에서는 투여 8주째 유의성 있게 감소함을 보였다 (Figure 2, P<0.01).

### 4. 혈당 변화 및 인슐린 저항성 (항당뇨 효과)

십조탕 물추출물의 투여가 제 2형 당뇨 모델인 db/db 마우스의 혈당에 미치는 영향을 알아보기 위해 약물 투여 8주부터 16주까지 4주에 한번 공복 혈당을 측정 하였다. 실험 시작 시 공복 혈당은 모든 실험군에서 90-110 mg/dl 수준으로 각 군 간의 큰 차이를 보이지 않았으나, 실험 시작 후 당뇨군에서 급격한 증가를 보였으며, 12주째 유의한 증가와 함께 실험 종료 시까지 계속해서 증가하는 양상을 보여주었다 (P<0.01). 반면, 십조탕을 투여한 군에서는 당뇨군에 비해 유의한 감소를 보여줄 뿐만 아니라 그 증가율이 억제되는 것을 실험 기간 내내 관찰 할 수 있었다 (Figure 3A, P<0.01). 또한 인슐린 저항성에 대한 십조탕의 영향을 알아보기 위해 혈중 인슐린 농도 및 이를 바탕으로 한 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR을 측정한 결과, 혈중 인슐린 농도는 높은 혈당에도 불구하고 당뇨군에서 현저한 증가를 보였으며, 십조탕 투여군에서는 반대로 감소함을 나타냈다 (Figure 3B, P<0.01). HOMA-IR 값 역시 당뇨군에서

정상군에 비해 4배 가량 증가함을 보였고, 십조탕 투여에 의해 약 2배 정도 감소하였다 (Figure 3C,  $P < 0.01$ ).

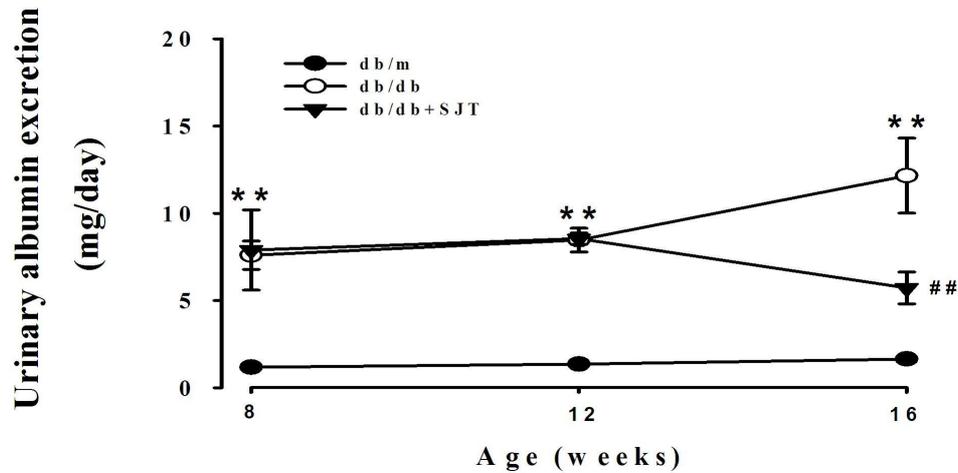


Figure 2. Changes in Urinary albumin excretion, in non-diabetic db/m and diabetic db/db mice treated with or without Sibjotang. A 24-h pooled urine sample was collected in a metabolic cage at 8, 12, and 16 week of age for each mouse. Urine samples were processed to measure urinary albumin concentrations using a competitive ELISA. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\* $P < 0.01$  vs. db/m mice; ## $P < 0.01$  vs. db/db mice.

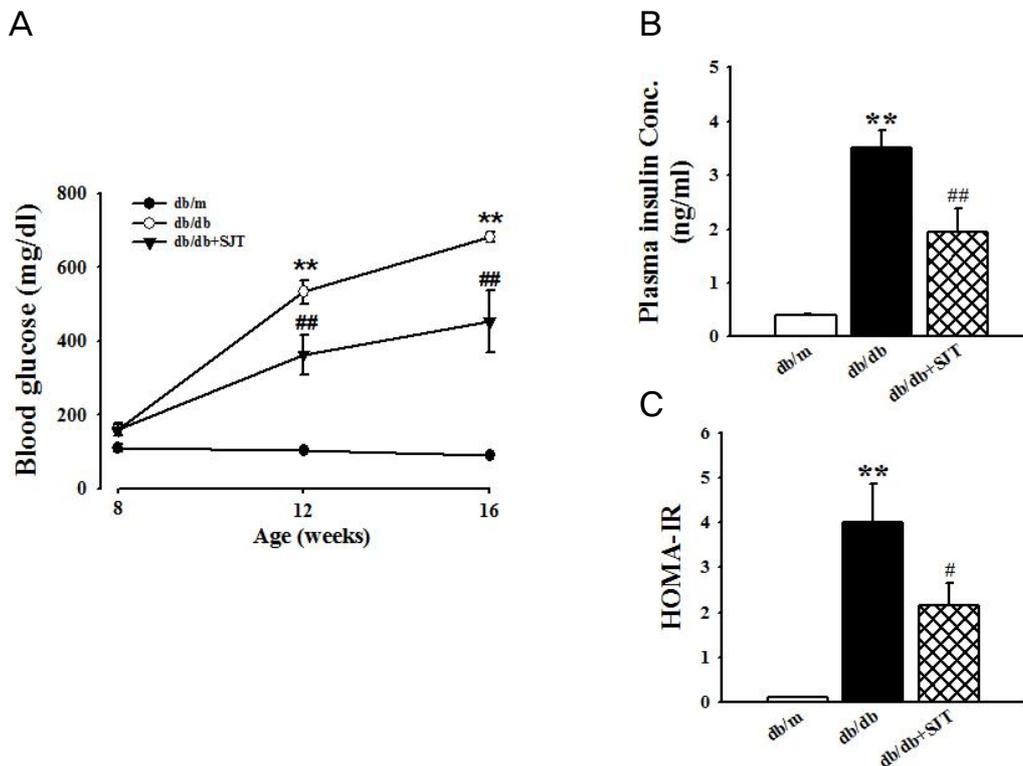


Figure 3. Changes in (A) Blood glucose, (B) plasma insulin, and (C) HOMA-IR in non-diabetic db/m and diabetic db/db mice treated with or without Sibjotang for 2 months starting at age of 8 weeks. Overnight fasting blood glucose and HOMA-IR were determined as described in 'Material and Methods'. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\* $P < 0.01$  vs. db/m mice; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. db/db mice.

## 5. 신장의 조직 병리학적 변화 및 TGF- $\beta$ 1 발현에 대한 변화 분석

제 2형 당뇨모델에서 십조탕이 신장의 조직 병리학적 변화를 측정하기 위해 PAS 염색을 시행하였다. 그 결과, 정상군에서 관찰되지 않았던 기저막(basement membrane)의 비후나 메산지움 기질(mesangial matrix)을 포함한 세포외기질

(extracellularmatrix: ECM)의 팽창이나 축적이 관찰되었다. 십조탕을 투여한 군에서는 사구체 기저막의 약간의 비후가 관찰되었으나 정상군과 유사하게 회복되었고, 메산지움 기질을 포함한 세포외기질의 일부 축적이 관찰되었으나, 이 역시 정상군에 비해 현저히 낮았다 (Figure 4). 또한, 메산지움 기질의 팽창 정도를 평가하기 위해 사구체내에서의 메산지움 기질이 차지하는 비율을 분석한 결과, 정상군에 비해 당뇨군에서 유

의한 증가를 보였으며, 십조탕 추출물 투여에 의해 메산지움의 팽창이 억제됨이 나타났다 (Figure 4).

당뇨병성 신병증에서 사구체내 비후를 매개하는 주요 증식 인자인 TGF-β1에 대한 십조탕의 영향을 알아보기 위해 면역

조직화학염색법을 시행한 결과, 당뇨병에서  $3.25 \pm 0.08$ 로 정상군 ( $1.00 \pm 0.07$ )이 비해 현저한 증가를 보였다. 그러나 십조탕 투여군에서  $2.05 \pm 0.09$ 로 유의한 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5,  $P < 0.01$ ).

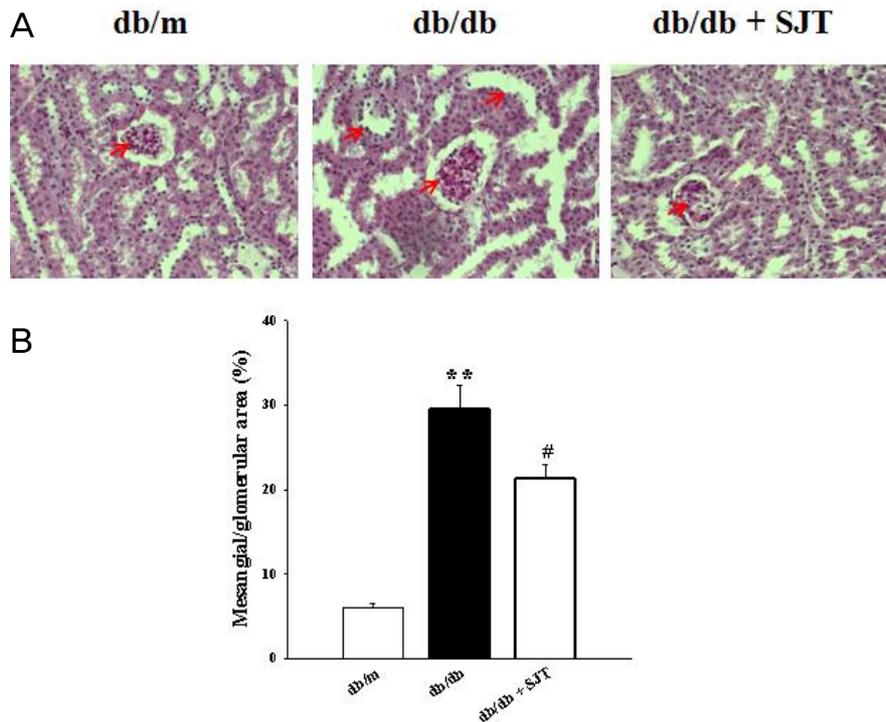


Figure 4. Renal morphology in non-diabetic db/m and diabetic db/db mice treated with or without Sibjotang. (A) Kidney sections (4 μm) were stained with PAS (Original magnification : x400). (B) Quantitative comparison of mesangial/glomerular area in non-diabetic db/m and diabetic db/db mice. Values are expressed as mean ± S.E. \*\* $P < 0.01$  vs. db/m mice; # $P < 0.05$  vs. db/db mice.

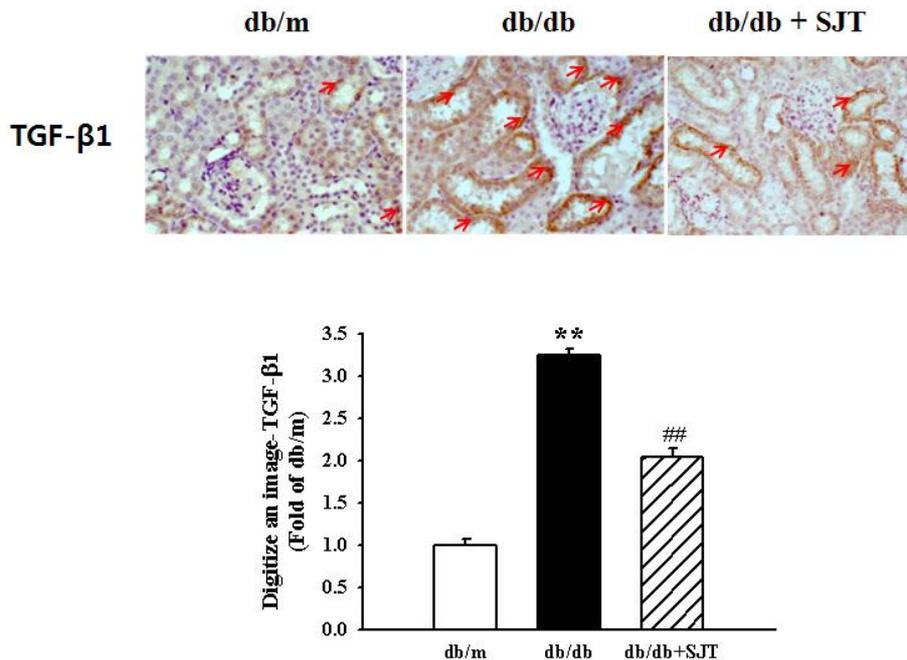


Figure 5. Effect of Sibjotang on TGF-β1 level in kidney tissues. Typical findings of TGF-β 1 immunohistochemical staining in glomeruli of untreated db/db mice and the Sibjotang-treated db/db mice (Original magnification: X400). Each electrophoretogram is representative of the results from three independent experiments. Values are expressed as mean ± S.E. \*\* $P < 0.01$  vs. db/m mice; ## $P < 0.01$  vs. db/db mice.

## IV. 고 찰

당뇨병의 주요 합병증 중 하나인 당뇨병성 신증의 발병은 최근 증가하는 추세를 보이고 있으며, 생활의 질을 감소시키거나 수명을 단축시켜 당뇨병의 급격한 증가와 더불어 중대한 사회문제가 되고 있다. 십조탕은 원화(芫花), 감수(甘遂), 대극(大戟), 그리고 대조(大棗)의 4가지 약재로 구성된 복합 처방으로 상한론에 처음 기재되어져 있으며 부종 등의 치료에 사용되어 체액의 항상성 조절에 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 현재까지 십조탕에 대한 연구로는 박동 관류 심방모형에서의 심방이노호르몬(ANP)의 분비를 증가시켜 체액 및 순환계의 항상성 조절에 영향을 미친다는 내용이 있으나<sup>11)</sup>, 당뇨 혹은 당뇨병성 신장 손상과 관련된 연구는 진행된 적이 없었다. 본 연구는 십조탕 물추출물을 제 2형 당뇨 모델인 db/db mice에 투여하여 십조탕의 혈당강하 및 신장 기능 개선 효과를 조사하고자 하였다. 실험은 정상군 (db/m mice), 당뇨군 (db/db mice), 그리고 십조탕군 (db/db+십조탕 100 mg/kg/day)인 3군으로 나누어 총 8주간 진행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험기간 8주 동안의 체중 및 식이 섭취량의 변화는 정상군과 비교 했을 때, 당뇨군에서 모두 유의하게 증가된 것을 관찰 할 수 있었으나, 십조탕 투여로 인한 차이는 나타나지 않았다. 반면, 당뇨가 유발된 군에서 크게 증가된 음료 섭취량은 십조탕 투여에 의해 감소되는 것으로 관찰되었다. 또한, 실험 종료 후, 각 군의 body type 및 waist line이 당뇨군에 비해 십조탕 투여 군에서 현저하게 감소된 것으로 볼 수 있었다. 이 결과들로 십조탕은 당뇨에 의한 체중변화에는 영향을 미치지 않는나 물의 과다 섭취 및 waist line을 감소시키는데 효과를 가짐을 알 수 있었다. 이는 제2형 당뇨 동물모델에서 체중변화 및 식이 섭취량에 변화 없이 약물이 당뇨 개선에 효과를 가진다는 선행연구들과 유사하다<sup>18-20)</sup>.

제2형 당뇨는 고혈당, 비정상적 인슐린 분비, 인슐린의 생물학적 효과 감소 등에 의해 유발하게 되며, 따라서 공복 시의 혈당은 당뇨병의 중요한 지표로 이용되고 있다<sup>21)</sup>. 8주간 십조탕 투여에 의한 혈당의 변화를 관찰한 결과, 당뇨에 의해서 증가된 혈당이 십조탕 투여 4주 후부터 현저하게 감소되는 것을 확인 하였다. 일반적으로 혈당은 인슐린에 의해 조절되기 때문에 인슐린 분비가 많으면 혈당이 떨어지게 되는데, 같은 혈당이라도 혈중 인슐린이 높다는 것은 동일한 상태를 유지하는데 많은 인슐린이 필요하다는 것이다. 이같이 인슐린의 작용이 떨어지는 상태를 인슐린 저항성 이라고 하고 이 인슐린 저항성은 당뇨병 발생에 결정적인 인자로 알려져 있다<sup>22, 23)</sup>. 본 실험에서 십조탕의 투여는 혈중 인슐린 농도를 저하시켰을 뿐만 아니라 Homa-IR을 감소시켜 인슐린 저항성을 개선한 것으로 나타났으며, 이 같은 결과는 제2형 당뇨 모델에서의 혈당 강하 효과에 대한 선행 연구들<sup>24, 25)</sup>과 유사하다. 십조탕의 혈당 강하 효과가 인슐린 분비 촉진에 의한 것인지 혹은 인슐린 저항성 개선에 의한 것인지 등과 같은 그 작용 기전에 대해서는 차후의 연구가 더 수행되어야 하겠지만, 십조탕 추출물은 혈당상승에

대한 억제효능을 가지며, 당뇨로 인한 여러 가지 합병증의 유발로의 진행을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

당뇨병에 의한 신장의 기능이상에 대표적인 증상으로는 미세단백뇨로 단백질 소변으로 배출되는 것을 말하는데, 단백질뇨 중 당뇨병성 신증 초기의 지표가 되는 것은 알부민으로 알려져 있다. 당뇨병성 신증 초기의 변화는 고혈당이 개선됨에 따라 정상으로 회복된다. 그러나 단백질뇨가 지속적으로 나타나면 저알부민혈증, 부종 등의 신증후군이 되며 결과적으로 만성 신질환으로 진행 된다<sup>26)</sup>. 따라서 당뇨병성 신증이 진행됨에 따라 발생할 수 있는 저알부민혈증에 대한 십조탕의 영향을 알아보기 위해 알부민뇨 분비량을 관찰하였다. 당뇨에 의해 증가된 알부민뇨의 분비는 십조탕 투여에 의해 실험 시작 4주까지는 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 4주가 넘어가면서부터 십조탕을 투여한 군에서의 요속 알부민 농도는 현저하게 감소되는 것을 보였다.

또한, 당뇨병성 신증에 의한 신장 기능 이상의 또 다른 대표적인 지표 중 하나인 BUN의 경우 정상군에 비해 제2형 당뇨 마우스 모델에서 유의한 증가를 나타내었다. 이는 당뇨군에서 당뇨병성 신증이 유발되었음을 보이는 결과이다. 그러나, 십조탕 투여에 의해 BUN의 수치는 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 이런 결과들을 볼 때, 십조탕 추출물의 투여 혈중 BUN의 감소에는 영향을 미치지 않는나, 알부민뇨의 분비 개선을 통해 당뇨병성 신증의 진행 억제에 영향을 미칠 것으로 사료되며, 이는 이전의 연구 결과에서도 당뇨모델에서 혈중 BUN 함량에 약물의 효과를 보이지 않았으나 신장 손상 개선 효과를 가지는 것과 유사하다<sup>21)</sup>.

당뇨병성 신증은 사구체 경화화 같은 병리학적 소견을 가지며 그 특징으로는 사구체 간질의 확장, 사구체 기저막과 내피세포, 외피세포들의 비후, 메산지움 기질을 포함한 세포외기질의 축적 등이 있다<sup>27)</sup>. 당뇨병성 신증에 의한 사구체의 조직학적 변화를 알아보기 위해 PAS 염색을 수행한 결과, 제2형 당뇨에 의해 사구체 기저막의 비후와 함께 메산지움 기질의 팽창이 관찰되었다. 그러나, 십조탕 투여군에서는 정상군 수준까지는 아니지만 사구체 기저막의 비후정도가 현저히 낮게 나타났다. 또한 십조탕은 사구체 내에서 메산지움 기질이 차지하는 비율을 분석한 결과에서 당뇨군에 비해 현저한 증식 억제 효과를 보였다 ( $P < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 1은 세포성장 및 세포분화의 조절 뿐 아니라 ECM 합성을 유발하는 cytokine으로 collagen과 fibronectin 등의 단백질 발현을 상승시켜 각종 조직에서 섬유화를 매개하는 인자로 알려져 있다<sup>28)</sup>. 당뇨병 환자와 실험적 당뇨병에서 사구체내 TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 1에 의해 유발되는 ECM 단백질의 표현이 증가되어 있는 것이 관찰되었고<sup>29)</sup> 세포배양 실험에서는 고포도당이 TGF- $\beta$ 1 mRNA와 단백질, TGF- $\beta$ 1 수용체의 수와 mRNA, 그리고 단백을 증가시키는 것이 관찰되었다<sup>30)</sup>. 본 실험에서는 TGF- $\beta$ 1의 발현 정도를 비교하여 십조탕이 당뇨병성 신증의 진행 정도에 미치는 영향을 평가하였다. 면역조직화학염색법을 통해 TGF- $\beta$ 1의 발현을 살펴본 결과, 정상군에 비해 당뇨군에서 사구체 내의 TGF- $\beta$ 1의 발현이 현저하게 증가함을 보였고, 십조탕 투

여군에 의해서 유의한 감소가 관찰되었다. 이를 통해 십조탕이 사구체 내에서의 TGF- $\beta$ 1 발현 및 메산지움의 과증식을 억제시킴으로써 당뇨에 의한 신장 기능 손상에 대한 개선 효과를 가질 것으로 사료된다.

십조탕의 신장 손상 개선 효과는 알부민뇨 분비 저해, 혈당 강하 및 인슐린 저항성의 개선 뿐 만 아니라 TGF- $\beta$ 1의 발현 억제에 의한 것으로 사료되며, 제2형 당뇨에 의해 유발될 수 있는 당뇨병성 신장 합병증의 치료에도 작용 가능할 것으로 보인다. 따라서 이에 대한 좀 더 깊이 있는 연구를 통해 십조탕이 당뇨에 의한 질환 치료에 우수한 보조제로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

십조탕 물추출물을 제 2형 당뇨 모델인 db/db mice에 투여한 후, 십조탕의 혈당강하 및 신장 기능 개선 효과를 연구한 결과는 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중 및 waist line의 변화를 측정 한 결과, 십조탕 투여는 체중의 증감에 큰 영향을 미치지 않지만, waist line이 당뇨군에 비해 십조탕 투여 군에서 현저하게 감소된 것으로 볼 수 있었다
2. 혈장 내 지질 함량을 측정 한 결과, 십조탕 투여는 중성 지질과 담즙정체의 지표인 T-Bilirubin의 혈중 함량을 유의하게 감소시켰다.
3. 신장 기능 개선에 대한 영향을 알아보기 위해 노 알부민 배설량을 측정 한 결과, 십조탕 투여는 투여 8주 째 유의성 있게 감소함을 보였다 ( $P < 0.01$ ).
4. 공복시 혈당 변화 및 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR을 계측한 결과, 십조탕 투여는 혈당을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났으며, HOMA-IR 값 역시 십조탕 투여에 의해 약 2배 정도 감소함을 보였다 ( $P < 0.01$ ).
5. 신장의 조직 병리학적 변화를 측정한 결과, 십조탕은 당뇨군에 비해 메산지움 부분의 팽창이 억제됨을 관찰 할 수 있었으며, 사구체내 비후를 매개하는 주요 증식인자인 TGF- $\beta$ 1 발현 역시 십조탕 투여에 의해 현저하게 감소 되는 것을 볼 수 있었다.

이상의 결과로 보아, 십조탕 추출물의 투여는 제 2형 당뇨 모델인 db/db mice에서 알부민뇨 분비 저해, 혈당 강하 및 인슐린 저항성의 개선 뿐 만 아니라 TGF- $\beta$ 1의 발현 억제를 통해 당뇨병성 신장 합병증의 치료에 효과적일 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문의 연구는 원광대학교 (2015)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kim JY, Park JY, Lee KU. Diabetes and traditional medicine effect of several traditional drug on the plasma glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Korean Diabetes Assoc.* 1994 ; 18 : 377-80.
2. Lee DY, Park SL, Nam YD, Yi SH, Lim SI. Anti-diabetic Effects of Fermented Green Tea in KK-Ay Diabetic Mice. *Korean Olean J Food Sci Technol.* 2013 ; 45(4) : 488-94.
3. Lee BR, Koh KO, Park PS. Antihyperglycemic Effects of Green Tea Extract on Alloxan-Induced Diabetic and OLETF Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2007 ; 36(6) : 696-702.
4. Hong GH, Lee KH, Jeong GH, Kim YS, Lee HJ. The Effects of Gypsum on Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathic Rat. *Korean J Orient Int Med.* 2008 ; 29(4) : 1025-36.
5. Kim SD, Kim YS. Beneficial effect of Samgijiwhang Tang on Diabetic Nephropathy Rats. *J Korean Oriental Med.* 2006 ; 27(3) : 77-87.
6. Kim YY, Choue RW, Chung SH, Koo SJ. Anti-hyperglycemic effect of Cortex Mori radices in db/db mice. *Korean J Food Sci Technol.* 1999 ; 31 : 1057-64.
7. Bailey CJ. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem Pharmacol.* 1999 ; 58 : 1511-20.
8. Dallas C, Gerbi A, Tenca G, Juchaux F, Bernard FX. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine.* 2008 ; 15 : 783-92.
9. Chae MH, No JG, Jhon DY. Hangbisan sulfur-based oriental medicine, lowers the blood cholesterol level of ob/ob obese mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2007 ; 36 : 27-31.
10. Choi JM, Koo SJ. Effects of  $\beta$ -Glucan from *Agaricus blazei* Murill on Blood Glucose and Lipid Composition in db/db Mice. *Korean Olean J Food Sci Technol.* 2000 ; 12 : 1418-25.
11. Kwon OJ, Oh HC, Lee YJ, Kim HY, Tan R, Kang DG, Lee HS. Sibjotang Increases Atrial Natriuretic Peptide Secretion in Beating Rabbit Atria. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015 ; 268643.

12. Jeong HM, Kim YS, Ahn SJ, Auh MS, Ahn JB, Kim KY. Effects of *Zizyphus jujuba* var. *boeunensis* Extracts on the Growth of Intestinal Microflora and Its Antioxidant Activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011 ; 40(4) : 500-8.
13. Yu TJ. *Food Dongeuibogam*. Academibook, Seoul, Korea. 1999. 138-40.
14. Kim HK, Joo KJ. Antioxidative capacity and total phenolic compounds of methanol extract from *Zizyphus jujuba*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2005 ; 34 : 750-4.
15. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J Food Sci Technol*. 2006 ; 38 : 128-34.
16. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 ; 28 : 412-4.
17. Nam MH, Koo YC, Hong CO, Yang SY, Kim SW, Jung HL, Lee H, Kim JY, Han AR, Son WR, Pyo MC, Lee KW. In vivo Study of the Renal Protective Effects of *Capsosiphon fulvescens* against Streptozotocin-induced Oxidative Stress. *Korean Olean J Food Sci Technol*. 2014 ; 46(5) : 641-7.
18. Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Jung HO, Lee MY. Effects of Soybean and DJI Chungkukjang Powder on Blood Glucose and Serum Lipid Reduction in db/db Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012 ; 41(8) : 1086-93.
19. Seo BH, Kim KO, Lee JH, Lee HS. Effects of phytoestrogens on glucose metabolism in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice. *Korean J Nutr*. 2011 ; 44 : 275-83.
20. Stancoven A, McGuire DK. Preventing macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: glucose control and beyond. *Am J Cardiol*. 2007 ; 99 : 5H-11H.
21. Shin HK, Ryu CR. Effects of Herb-Combined Remedy (HCR) on blood glucose levels and Diabetic nephropathy in STZ-induced Diabetic Rats. *J Kor Acup Moxi*. 2008 ; 25(3) : 115-25.
22. Reaven GM, Laws A. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinaemia and coronary heart disease. *Diabetologia*. 1994 ; 37 : 948-52.
23. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia. *Diabetes Care*. 2008 ; 31 : S262-8.
24. Kwon HO, Lee MH, Kim YJ, Kim E, Kim OK. Beneficial Effects of *Acanthopanax senticosus* Extract in Type II Diabetes Animal Model via Down-Regulation of Advanced Glycated Hemoglobin and Glycosylation End Products. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016 ; 45(7) : 929-37.
25. Kim DJ, Jeong YJ, Kwon JH, Moon KD, Kim HJ, Jeon SM, Lee MK, Park YB, Choi MS. Beneficial effect of chungkukjang on regulation blood glucose and pancreatic  $\beta$ -cell functions in C75BL/KsJ-db/db mice. *J Med Food*. 2008 ; 11 : 215-23.
26. Seo SH, Kim YS. The effect of Yookmijihwang-tang (Yookmijihwang-tang:YJT) on Mice with Diabetic nephropathy Induced by Alloxan. *Korean J Orient Int Med*. 2005 ; 26(4) : 741-52.
27. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007 ; 27 : 195-207.
28. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 1994 ; 93 : 2431-7.
29. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int*. 2006 ; 70 : 1914-9.
30. Yoon JJ, Lee YJ, Lee SM, Kang DG, Lee HS. Oryeongsan suppressed high glucose-induced mesangial fibrosis. *BMC Complement Altern Med*. 2015 ; 15 : 30.