

췌장베타세포에서 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨병 실험 모델에 대한 팔미원의 영향

이인순 · 이인자*

포항공과대학교 생명과학과, 효성가톨릭대학교 약학대학*

Effect of Palmiwon on the Streptozotocin induced Prediabetic Model in Pancreatic Beta Cells

Ihn-Soon LEE and In-ja RHEE*

Department of Life Science, University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea
College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyoseung, Kungsan 713-702, Korea

(Received July 15, 1998; accepted September 11, 1998)

Abstract – The aim of the present study was to investigate the effect of Palmiwon on the type 1-prediabetic models induced by streptozotocin (STZ) in RINm5F cells and HIT-T15 cells. Palmiwon increased the cell proliferation and insulin release when pre- and post-treated for the STZ-exposed pancreatic beta cells. The cell proliferation and insulin release of these beta cells were measured by ³H-thymidine uptake and RIA, respectively. We also analyzed nutrients such as sugars, fatty acid and amino acids and minerals containing in Palmiwon using by gas chromatography, amino acid analyzer and AA spectrometer, respectively. Palmiwon seems to have protective and recovery properties on the prediabetic model in cellular level, which were ascribe to various nutrients and minerals containing in Palmiwon. From these results, it could be suggested that Palmiwon may be available as preventive and therapeutic prescription of type 1 diabetes mellitus.

Keywords □ Palmiwon, streptozotocin, type 1 diabetes mellitus, RINm5F cells, HIT-T15 cells, insulin release, cell proliferation

八味元은 金櫃要略(Park, 1978), 東醫寶鑑(Heo, 1979), 方藥合編(Hwang, 1989) 등에 수록되어 있으며, 숙지, 산약, 산수유, 택사, 복령, 목단피, 계지, 부자로 구성되어 있다. 처방의 藥理作用을 살펴보면, 숙지, 산약, 산수유는 滋養強壯效果로 세포에 영양을 공급하여 세포기능을 활성화시키며, 택사, 부자, 복령은 腎臟機能強化로 利尿增進 효과가 있고 산수유, 부자, 계지, 목단피는 血管張力強化, 免疫反應調節作用 등이 있다고 한다(Han, 1988). 八味元은 임상적으로 腎臟疾患, 排尿異常症, 高血壓, 糖尿病, 神經症, 腰痛, 麻痺 등에 널리 사용되고 있다(Park, 1978; Heo, 1979; Hwang, 1989).

지금까지의 팔미원 관련 연구들을 보면 Streptozotocin에 의한 실험적 당뇨 백서에서의 항당뇨병 작용(Shin, 1994; Kang, 1993; Yama, 1981), 기아백서 혈청중 전해질 및 대사 기질의 변동에 대한 연구(Shin & Kim, 1982), 신성 고혈압

에 미치는 영향(Rho et al, 1984), 췌장 소도세포와 면역세포에 미치는 영향(Lee & Rhee, 1994), In vitro 면역 조절작용(Lee & Rhee, 1994) 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 이미 보고된 팔미원의 항당뇨병 작용(Shin, 1989; Kang, 1993; Yama, 1981), 면역 조절작용(Lee & Rhee, 1994)과 췌장세포와 면역세포에 대한 작용(Lee & Rhee, 1995)등을 고려하여, 세포 수준에서 streptozotocin으로 유도한 제 1형 당뇨병 실험모델(Lee et al, 1997)에 대한 팔미원의 효과를 조사하였으며, 본 실험에 사용한 팔미원 수추출액의 일반성분을 분석하였다.

실험방법

시약

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640 medium(Sigma, USA), Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL), Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, USA), Streptozotocin(Sigma, USA), [methyl-

* To whom correspondence should be addressed.

³H] Thymidine(Amersham, USA), Insulin RIA Kit(Eiken, Japan), Rat Standard Insulin(Novo, Japan), Trypsin EDTA (Gibco BRL, USA), Scintillation cocktail(Aqualuma Plus, Lumac, Netherland) 등이며 그외의 시약은 특급 및 일급시약을 사용하였다.

시료 조제

팔미원 1첩을 칭량하여 그 10배의 증류수를 가하여 3시간 가열 추출하였다. 이 추출액을 여과하고 그 여액을 Rotary evaporator를 이용하여 1/2정도의 용량으로 감압 농축시킨 후, 농축액을 Freezing Dryer에서 동결 건조하여 분말화하였다. 이렇게 하여 얻어진 팔미원 건조분말을 칭량하여 KRB(Krebs Ringer Buffer, 129 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.0 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 0.2 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin, 10 mM Hepes, pH 7.4)에 녹이고 0.2 µm filter (Millipore, Molsheim, France)를 통과시킨 후 시료로 사용하였다.

세포 배양

세포주는 ATCC(American Tissue Culture Collection)에서 구입한 RINm5F와 HIT-T15 세포를 실험에 사용하였다. 흰쥐와 햄스터에서 유래한 췌장 베타세포주 RINm5F(Varey et al, 1988)와 HIT-T15(Regazzi et al, 1990)세포는 각각 10% FBS, penicillin-streptomycin(100u-100 µg/ml), 5.5 mM glucose가 함유된 RPMI 1640배지(complete medium, CM)에서 3-4일 간격으로 계대 배양하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지시켰다. 실험을 위해서는 매 실험 1-2일전 배양된 세포를 KRB로 2회 세척하고 0.25% Trypsin-EDTA 용액으로 세포를 분리시켜 5 × 10⁴ cell/ml 농도의 세포를 12 well plate에 분주하고 안정화시켜서 실험에 사용하였다.

팔미원의 영향

췌장베타세포주(RINm5F, HIT-T15)에서 STZ로 유도한 당뇨병 실험 모델에 대한 팔미원의 효과를 알아보기 위하여, STZ로 당뇨병 실험 모델을 만들기 전 또는 후에 팔미원을 처리하였다. 각각의 베타세포주에 대하여 STZ에 의한 당뇨병 실험모델은 이미 보고된 당뇨병 모델 수립시 사용한 농도조건(Lee et al, 1997)과 STZ 처리 방법(Eizirik et al, 1987)에 따라 만들었다. 즉, STZ를 사용하기 바로 직전에 citrate buffer(10 mM, pH 4.5)에 녹인 후, 미리 준비된 세포에 적용시키고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 팔미원이 STZ로 유도되는 세포수준의 제 1형 당뇨병 실험모델에 대하여 예방효과가 있는지의 여부를 알아보기 위한 실험은 미리 준비된 췌장세포를 48시간 팔미원 함유 또는 팔미원 미함유 배지에서 배양하고 STZ를 처리한 후, 췌장 베타세포의 인슐린 분비정도와 세포 활성 정도를 측정하여 팔미원의 제 1형 당뇨병 발병에 대한 예방 효과를 검토하였다. 또 팔미원이 STZ에 상해된 베타세포에 대

하여 보호 또는 치료 작용을 나타낼 수 있는지의 여부를 알아보기 위한 실험은 STZ에 미리 노출시킨 췌장 베타세포를 팔미원 함유 또는 팔미원 미함유 배지에서 48시간 배양한 후, 인슐린 분비와 세포활성 정도를 측정하였다.

세포활성

베타세포의 세포활성 정도는 thymidine uptake법으로 관찰하였다(Rabinovitch, 1985). 세포 배양을 마치기 24시간 전에 배양액내에 2 µci의 methyl-³H-thymidine을 넣고 배양한 후, 배양액의 상층액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음, 0.5 N-NaOH 500 µl/well을 넣어 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 골고루 섞은 다음, 용해액 200 µl를 취하여 Scintillation cocktail(Aqualuma Plus) 10 ml을 넣고 β-counter(Beckman, USA)로 3H의 편입정도를 측정하였다.

인슐린 분비

인슐린분비 정도는 방사면역법(RIA: radioimmunoassay)으로 측정하였다(Johnstone & Thorpe, 1987). 각 실험 조건으로 배양한 베타세포의 상층액을 PBS로 적절하게 희석하여 희석한 상층액을 분석시료로 200 µl/tube씩 취하였다. Standard로는 쥐 인슐린을 사용하였으며, 각 농도별 standard solution을 200 µl/tube씩 취하여 standard curve 작성에 사용하였다. Antibody로는 guinea pig antiporcine insulin antiserum을 사용하여 시료 및 표준 인슐린 용액에 각각 200 µl씩 넣었다. 여기에 ¹²⁵I-insulin 용액을 각 시험관에 200 µl씩 넣었으며 총 ¹²⁵I-insulin 양을 알기 위해서 한개의 시험관에는 ¹²⁵I-insulin만 200 µl 넣었다. 각 시험관을 잘 흔들어서 마개를 하고 실온에서 하룻밤 방치한 후 총 ¹²⁵I-insulin 측정용 시험관을 제외한 나머지 시험관의 상층액을 버리고 반응하지 않은 ¹²⁵I-insulin을 깨끗이 제거한 다음 ¹²⁵I-insulin-antibody 중의 radioactivity를 γ-counter로 측정하였다.

팔미원의 일반성분 분석

본 실험에 사용한 팔미원 水 抽出液의 냉동 건조분말의 성분분석을 다음과 같이 행하였다.

당(Sugars)

시료를 70°C 수욕상에서 pyridine에 용해시키고 HMDS(hexamethyl disilazane)와 TFA(trifluoro acetic acid)를 가하여 TMS 유도체화하여 Gas Chromatography로 분석하였으며 분석조건은 다음과 같았다.

Instrument	HP 5890 series II
Column	SE-54 capillary column (30 m × 0.20 mm ID)
Detector	FID
Injection temp.	270°C
Detector temp.	300°C
Column temp.	Initial temp.—150°C for 5 min. Program rate—increase 7°C/min. Final temp.—300°C for 10 min.
Carrier gas	Nitrogen gas Flow rate—1.5 ml/min.

지방산 (Fatty acids)

건조분말 시료를 Folch법(Folch, 1957)으로 추출하여 Gas Chromatography를 이용하여 지방산을 다음과 같은 조건으로 분석하였다.

Instrument	HP 5890 series II
Column	Fused silica capillary HP-FFAP (25 m×0.32 mm ID)
Detector	FID
Injection temp.	250℃
Detector temp.	280℃
Column temp.	Initial temp.—160℃ for 2 min. Program rate—increase 10℃/min. Final temp.—240℃ for 10 min.
Carrier gas	Nitrogen gas Flow rate—1.5 ml/min.

아미노산(Amino acids)

건조분말시료를 0.2 N 염산용액으로 1시간 shaking한 다음 millipore filter로 여과하여 아미노산 분석용 검액으로 사용하여 아래와 같은 조건으로 분석하였다.

Instrument	Amino acid analyzer (Pharmacia LKB 4150 alpha)
Column	Sodium 4151 Series II(Pharmacia LKB)
Flow rate	Buffer 35 ml/hr., Ninhydrin 25 ml/hr.
Analysis cycle time	72 min
Column pressure	80-130 kg/cm ²
Ninhydrin pressure	15-35 kg/cm ²
Column temp.	53℃
Reaction coil temp.	135℃

미네랄(Mineral)

건조분말 시료를 초 순수증류수에 녹이고 습식법으로 회화시킨 후 AA spectrometer를 사용하여 다음 조건에서 분석하였다.

Instrument	Unicam 929 AA spectrometer
Current fuel flow rate	1.2 l/min~4.5 l/min
Flame type	Air/Acetylene N ₂ O/Acetylene
Gas pressure (psi)	Air—30 N ₂ O—40 C ₂ H ₂ —10

통계처리

통계처리는 SPSS프로그램을 사용하여 Student's unpaired/paired t-test로 검정하였으며 유의수준은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

실험결과

HIT-T15 세포에서 STZ으로 유도한 당뇨병 실험 모델에

대한 팔미원의 영향

햄스터 유래의 췌장 베타세포 HIT-T15 세포에서 streptozotocin으로 제 1형 전 당뇨병 실험 모델을 유도할 때 팔미원이 streptozotocin에 의한 베타세포 상해에 어떠한 영향을 나타낼 수 있는지를 베타세포의 인슐린 분비와 세포활성을 측정하여 알아보았다. Streptozotocin으로 유도한 전 당뇨병 실험모델에 대한 팔미원의 예방 및 회복 효과를 검토하였다. 예방효과(preventive effects)를 알아보기 위하여 팔미원 함유 배지에서 배양한 베타세포가 당뇨병 유발인자에 노출되었을 때 이의 공격으로부터 보호되어지는 정도를 베타세포의 인슐린 분비와 세포활성을 측정하여 조사하였고, 회복 효과(recovery effects)는 베타세포를 제 1형 당뇨병 유발환경인 streptozotocin에 먼저 노출시킨 후 팔미원 함유 배지에서 배양하여 베타세포의 세포독성 상해로부터 치유(repair)및 회복(recovery)되는 정도를 역시 인슐린 분비와 세포활성을 측정하여 알아보았다. 팔미원 함유 배지에서 미리 배양한 HIT-T15 세포를 streptozotocin으로 유도되는 당뇨병 실험 모델 수립 조건(Lee et al, 1997)에 노출시키면 팔미원 미함유 배지에서 배양한 대조군에 비해 팔미원 100 µg/ml, 1000 µg/ml 농도로 처리한 군에서 각각 12%, 35%의 유의성있는 세포활성 증가가 나타났으며, 인슐린 분비는 팔미원 1000 µg/ml 농도 처리군에서 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table I, II).

Streptozotocin으로 제 1형 전 당뇨병 실험모델이 유도된 HIT-T15 세포를 팔미원 함유 배지에서 배양했을 때 streptozotocin 손상으로부터 베타세포가 얼마나 회복될 수 있는가를 실험하였다. 팔미원을 100 µg/ml, 1000 µg/ml 농도로 처리하면 streptozotocin으로 손상받은 대조군에 비해 세포활성이 70~80% 증가하였으며, 인슐린 분비는 10~20%의 증가를 보여 유의성있는 회복효과(recovery effect)가 인정

Table I. Preventive and recovery effects of Palmiwon on the cell proliferation by ³H-thymidine uptake in STZ-induced prediabetic model of HIT-T15 cell

	STZ (mM)	PALMIWON (µg/ml)	³ H-thymidine uptake	
			cpm	% of STZ only treated group
pre-treatment	0	0	3909±154.7	normal
treatment	2	0	2355±87.1	100
	2	100	2641±81.6	112**
	2	1000	3176±132.5	135**
	2	0	2930±88.3	100
post-treatment	2	100	5102±109.1	174**
	2	1000	5315±128.7	181**

Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) compared with STZ only treatment group. Data are the means±standard deviation of three independent experiments.

Table II. Preventive and recovery effects of Palmiwon on the Insulin Release by RIA in the STZ-induced prediabetic model of HIT cell

	STZ (mM)	PALMIWON (µg/ml)	Insulin Release	
			ng/ml	% of STZ only treated group
pre-treatment	0	0	7.26±0.43	normal
	2	0	6.05±0.10	100
	2	100	6.33±0.25	105
	2	1000	6.59±0.12	109**
post-treatment	2	0	5.65±0.50	100
	2	100	6.92±0.25	123*
	2	1000	6.90±0.25	123**

Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) compared with STZ only treatment group. Data are the means±standard deviation of three independent experiments.

되었다(Table I, II). 이러한 결과는 streptozotocin으로 베타 세포에 손상을 가하기 전에 팔미원을 처리하는 전처리 효과에 비해 streptozotocin으로 베타세포에 손상을 가한 후 팔미원을 처리하는 후처리 효과가 더욱 현저하게 증가함을 보여 주었다. 팔미원 후처리 효과의 경우 세포활성은 streptozotocin과 팔미원을 처리하지 않은 정상대조군 보다 훨씬 높은 결과를 보여 주었으나, 인슐린 분비는 정상 대조군에 근접하는 값을 나타내었다. 이는 베타세포의 세포 활성화와 인슐린 분비가 정확하게 일치하지는 않는 것 같으며, 베타 세포가 파괴되기 시작하여 약 90%가 파괴되기 전까지의 기간인 제 1형 당뇨병 전 시기(prediabetic stage)에는 당뇨병의 임상증상이 나타나지 않는 것(Gepts, 1984)과 관련이 있을 것으로 생각되어 진다.

RINm5F cell에서 STZ으로 유도한 당뇨병 실험 모델에

Table III. Preventive and Recovery effects of Palmiwon on the cell proliferation by ³H-thymidine uptake in STZ-induced prediabetic model of RINm5F cell

	STZ (mM)	PALMIWON (µg/ml)	³ H-thymidine uptake	
			cpm	% of STZ only treated group
pre-treatment	0	0	4467±145.2	normal
	2	0	2097±105.9	100
	2	100	2449±76.9	117*
	2	1000	2595±70.5	124**
post-treatment	2	0	2792±116.2	100
	2	100	3222±199.5	115*
	2	1000	3918±132.1	140**

Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) compared with STZ only treatment group. Data are the means±standard deviation of three independent experiments.

Table IV. Preventive and Recovery effects of Palmiwon on the Insulin Release by RIA in the STZ-induced prediabetic model of RINm5F cell

	STZ (mM)	PALMIWON (µg/ml)	Insulin Release	
			ng/ml	% of STZ only treated group
pre-treatment	0	0	8.56±0.16	normal
	2	0	5.89±0.23	100
	2	100	6.30±0.38	107*
	2	1000	6.96±0.36	118**
post-treatment	2	0	5.55±0.22	100
	2	100	7.59±0.17	137**
	2	1000	8.05±0.37	146**

Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) compared with STZ only treatment group. Data are the means±standard deviation of three independent experiments.

대한 팔미원의 영향

Table III과 Table IV는 RINm5F 세포에서 streptozotocin으로 유도한 전 당뇨병 실험모델에 대한 팔미원의 예방 및 회복 효과를 알아본 결과이다. 베타세포에 상해를 가하기 전에 미리 팔미원 함유 배지에서 배양한 베타세포가 당뇨병 유발인자 streptozotocin에 노출되었을 때 streptozotocin 상태로 부터 보호되어지는 정도를 베타세포의 인슐린 분비능과 세포활성을 측정하여 조사하여 예방효과를 알아 보았다. 100 µg/ml 또는 1000 µg/ml의 팔미원으로 미리 배양된 RINm5F 세포는 대조군에 비해 세포활성은 각각 17%, 24% 증가 하였으며, 인슐린 분비는 각각 7%, 18% 증가하였다. 회복 효과(recovery effects)는 베타세포를 제 1형 당뇨병 유발환경인 streptozotocin에 먼저 노출시킨 후 팔미원 함유 배지에서 배양하여 베타세포 상해로부터 회복되는 정도를 알아보았다. RINm5F 세포를 streptozotocin으로 처리한 후, 팔미원 함유 배지에서 배양하면 대조군에 비해 세포활성과 인슐린 분비 모두 유의성있는 증가를 나타내었다. 그 증가 정도는 팔미원을 100 µg/ml 또는 1000 µg/ml 농도로 처리 하면 세포 증식이 각각 15%, 40% 증가하였으며, 인슐린 분비는 각각 37%, 46% 증가하였다. HIT T15 세포에서 처럼 RINm5F 세포에서도 세포증식 및 인슐린 분비에 대한 팔미원의 후처리 효과가 전처리 효과 보다 훨씬 크게 나타났으며, 그 회복 정도는 세포활성과 인슐린 분비 모두 정상대조군에 근접하는 값을 보여 주었다.

팔미원의 일반성분

STZ으로 유도한 당뇨병 실험모델에 대하여 유의적인 효과를 나타내는 팔미원 수추출액 냉동 건조 분말에 대하여 어떠한 영양물질들이 함유되어 있는지를 알아 보기 위하여 당, 지방산, 아미노산, 미네랄등을 분석하였다. 당 분석결과 fructose, glucose, sucrose가 확인되었으며, 그중 fructose 함량이

Table V. Contents of Sugar in Palmiwon

Sugar	Contents (%)
Glucose	11.0
Fructose	24.5
Sucrose	3.60

Table VI. Fatty acid composition of total lipid from Palmiwon

Fatty acid	Contents (%)	Fatty acid	Contents (%)
C14:0 Myristic acid	3.97	C18:1 Oleic acid	2.41
C16:0 Palmitic acid	23.61	C18:3 Linolenic acid	1.36
C16:1 Palmitoleic acid	12.72	C22:0 Beheric acid	8.21
C18:0 Stearic acid	7.75	C22:1 Erucic acid	3.46
Unknown	36.49		

Table VII. Contents of Amino acid in Palmiwon

Amino acid	Contents (mg/g)	Amino acid	Contents (mg/g)
Aspartic acid	0.44	Valine	0.012
Serine	2.00	Cysteine	0.026
Glutamic acid	1.80	Tyrosine	0.60
Proline	0.12	Lysine	0.024
Glycine	0.14	Phenylalanine	0.16
Alanine	1.16		

Table VIII. Contents of Mineral in Palmiwon

Mineral	Contents (mg/g)	Mineral	Contents (mg/g)
Ca	9.457	Fe	0.016
Mg	3.526	Mn	N.D.
K	27.840	Zn	0.129
Na	4.774	Se	0.025
Cu	0.006	Cd	N.D.

*N.D. means No Detected.

가장 많았다(Table V). 팔미원의 아미노산 분석 결과는 11종의 아미노산이 함유되어 있었으며, glutamic acid가 가장 많이 함유되어 있었고, valine, cysteine, lysine, phenylalanine과 같은 필수 아미노산도 함유되어 있었다(Table VI). 지방산의 분석 결과는 Table VII과 같으며, palmitic acid를 비롯한 8가지 지방산이 측정되었다. Table VIII은 팔미원내에 함유된 미네랄을 분석한 결과이다. 칼륨이 27.84 mg/g으로 가장 많이 검출되었으며, 그외 칼슘, 나트륨, 마그네슘, 아연, 셀레늄, 철 등이 함유되어 있었고, 망간과 카드뮴은 검출되지 않았다.

고 찰

Winkel과 Pipeleers(1986)에 의하면, 선택적인 베타세포

독성을 나타내는 alloxan, streptozotocin으로 손상을 받은 췌장 베타세포는 방어진을 작동하여, 니코틴아미드, 포도당, 비타민 등에 의해 손상된 베타세포가 복구되어질 수 있다고 한다. 이에 이번 연구에서는 90% 이상의 베타세포가 파괴되었을 때 발병하는 인슐린의존형 당뇨병의 예방에 예로부터 당뇨병 치료제와 보약 등으로 사용되고 있는 팔미원(Park, 1978; Heo, 1979; Hwang, 1989)이 streptozotocin으로 유도되는 제 1형 전 당뇨병 실험모델에 대하여 어떠한 영향을 나타내는지를 알아보고, 제 1형 전 당뇨병(prediabetes) 시기에 사용할 수 있는 새로운 치료법으로의 접근 가능성을 검토하였다. 팔미원을 streptozotocin으로 유도되는 당뇨병 실험모델 수립 전 후에 각각 적용하여 베타세포의 인슐린 분비능과 세포활성을 검토하였다. 예방효과(preventive effects)로는 팔미원 함유 배지에서 배양한 베타세포가 당뇨병 유발인자 streptozotocin에 노출되었을 때 이의 공격으로부터 보호되어지는 정도를 조사하였고, 회복효과(recovery effects)에서는 베타세포를 제 1형 당뇨병 유발 환경 streptozotocin에 먼저 노출시킨 후 팔미원 함유 배지에서 배양하여 베타세포가 세포독성 상해로부터 치유(repair) 또는 회복(recovery)되는 정도를 알아보았다. 이미 보고된 대로 팔미원이 베타세포에 대해 세포독성은 나타나지 않고 오히려 세포증식과 인슐린 분비를 증가시켰기 때문에(Lee & Rhee, 1995), 베타세포 상해 전 후의 팔미원 투여가 예방 또는 회복효과를 발휘할 수 있을 것이라는 기대를 하였다. 베타세포주(HIT T15 cell, RINm5F cell)에서 streptozotocin으로 유도한 실험 모델은 팔미원을 처리하였을 때, 세포증식 및 인슐린 분비 모두 유의적인 효과를 나타내었으며, 특히 후처리(posttreatment) 효과가 전처리(pretreatment) 효과 보다 강하게 나타나는 것으로 보아 베타세포가 streptozotocin에 노출된 후에 팔미원 투여로 세포상해로부터 회복할 수 있을 가능성을 시사하였다(Table I, II, III, IV). 본 실험에 사용한 HIT-T15 세포는 생리적, 약리적 자극에 적절한 반응성을 보유하여 생체내 정상 베타세포와 같은 특성을 가지므로 많은 연구자들이 베타세포 기능 연구에 유용한 모델(Zhang et al, 1989; Richardson et al, 1990)로 그 가치를 평가하고 있다. 이러한 HIT-T15 세포에서 streptozotocin으로 유도되는 세포 손상이 팔미원에 의해 뚜렷하게 개선되었다. 특히, 후처리 효과의 경우 세포활성은 정상 대조군 보다 더욱 높게 나타났으며, 인슐린 분비는 정상 대조군에 가까운 값을 나타내어, 세포활성과 인슐린 분비의 증가 정도가 정확하게 일치하지는 않았다. 이러한 실험 결과는 베타세포가 파괴되기 시작하여 약 90%가 파괴되기 전까지의 기간인 제 1형 당뇨병 전 시기(prediabetic stage)에는 인슐린 분비에 별다른 이상이 나타나지 않는 당뇨병의 임상증상(Gepts, 1984)과 관련이 있을 것으로 생각되어진다. 여러 가지 약제들에 의해 인슐린 분비가 적절하

게 변화되는 RINm5F 세포에서도 streptozotocin 상해를 받은 전 후 팔미원 처리로 세포활성과 인슐린 분비가 유의적으로 증가되어 정상 대조군에 근접하는 값을 나타내었다. 이러한 결과는 한방에서 별 부작용 없이 보약 등으로 사용되고 있는 팔미원이 제 1형 당뇨병의 예방과 치료에 응용할 수 있는 가능성을 제시해 준다. Streptozotocin의 선택적인 베타세포 독성은 streptozotocin 분자내의 포도당 잔기에 의하여 더욱 강화되어지며(Gunnarson, 1974), streptozotocin의 포도당 잔기가 미토콘드리아 DNA뿐만 아니라 세포내 다른 부분의 메틸화에 직접 관여할 것이라고 보고되어 있다(Eizirik et al, 1991). 현재까지 알려진 바에 의하면 STZ에 의해 유도된 세포독성은 고농도 포도당(Eizirik et al, 1988), 2-deoxy-glucose, 3-O-methyl-glucose(Rossini, 1980)로 차단되며, STZ과 베타세포 상해기전이 유사한 alloxan 유도 당뇨병에서 mannose와 fructose에 의한 보호효과(protective effect)가 보고되었다(Bhattacharya, 1953). 이와 같이 팔미원내에 함유된 fructose, glucose, sucrose 등과 같은 당류들은 streptozotocin에 의한 베타세포 상해와 베타세포 상해에 대한 보호 효과를 가진다고 알려진 당류(sugars)들의 포도당 잔기의 기능과 관련이 있을 것으로 생각되어진다. 또한 branched chain amino acid가 streptozotocin에 의해 유발된 세포독성에 대해 보호효과(protective effects)를 나타내는 것으로 알려져 있는데(Eizirik & Sandler, 1987), 팔미원내의 여러가지 종류의 아미노산들이 이와 같은 작용에 기여할 수도 있다고 생각되어진다. 한편 당뇨병의 병리 과정을 연구하는 실험모델에서 Vitamin E와 selenium이 streptozotocin에 대한 베타세포의 감수성을 저하시킨다는 보고(Asayama et al, 1986)를 고려해 보면 팔미원내에 함유된 selenium등의 미네랄들이 베타세포 특이성 세포독성 인자들에 대한 방어기전에 관여할 수 있다고 생각되어진다.

따라서 이번 실험 결과에서 보여주는 streptozotocin으로 유도되는 제1형 전 당뇨병 실험 모델에 대한 팔미원의 작용들은 정확한 기전은 알 수 없으나, 팔미원에 함유된 여러가지 영양물질과 미네랄들에 의해 streptozotocin에 의한 췌장 베타세포 상해에 유익한 효과를 발휘하는 것으로 사료되어진다.

참고문헌

- Asayama, K., Kooy, N. W. and Burr, I. M. (1986). Effect of Vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets. *J. Lab. Clin. Med.* **107**, 459-464.
- Bhattacharya, G. (1953). Protection against Alloxan Diabetes by Mannose and Fructose. *Science* **117**, 230-231.
- Brelje, T. C., Darsons, J. A. and Sorenson, R. L. (1994). Regulation of Islet β -Cell proliferation by Prolactin in Rat Islets. *Diabetes* **43**, 263-273.
- Eizirik, D. L., Sandler, S., Ahnstrom, G. and Welsh, M. (1991). Exposure of pancreatic islets to different alkylating agents decreases mitochondrial DNA content but only streptozotocin induces long lasting functional impairment of beta cells. *Biochem. Pharmacol.* **42**(12), 2275-2282.
- Eizirik, D. L., Strandel, E. and Sandler, S. (1987). Culture of mouse pancreatic islets in different glucose concentrations modifies B cell sensitivity to streptozotocin. *Diabetol.* **31**, 168-174.
- Eizirik, D. L. and Sandler, S. (1987). The Partial Protective Effect of Branched Chain Amino Acids against Streptozotocin-induced Cytotoxicity to Mouse Pancreatic Islets *in Vitro. Pharmacol. Toxicol.* **61**, 320-324.
- Folch, J., Mee, L. and Stanley, G. S. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-480.
- Gepts, W. (1984). The pathology of the pancreas in human diabetes *In Immunology in Diabetes*. Andreani D et al (Eds), Kimpton Medical Publication London, 21-34.
- Gunnarson, R., Berne, C. and Hellerstrom, C. (1974) Cytotoxic Effects of Streptozotocin and N-Nitrosomethylurea on the Pancreatic B Cells with Special Regard to the Role of Nicotinamide-Adenin Dinucleotide. *Biochem. J.* **140**, 487-492.
- Han, D. S. (1988). *Pharmacognosy*, pp. 110, 116, 156, 159, 229, 174, 283, 356. Dongmyungsa.
- Heo, J. (1979). *Donguibogam*, pp. 131, Namsandang.
- Hwang, D. Y. (1989). *Bangyakhappeun*, pp. 167, Namsandang.
- Kang, J. K. Rhee, I. J. (1993). The effect of palmiwon and gli-clazide on the streptozotocin induced diabetic rats. *J. Appl. Sci. Res. Inst. Hyosung.* **2**, 115-120.
- Lee, I. S., Rhee, I. J. (1995). Effects of Palmiwon on the cell viability of immune cell and beta cell. *Yakhak Hoeji* **39**(5), 541-547.
- Lee, I. S., Rhee, I. J. (1996). In vitro immunomodulating effects of Palmiwon. *Yakhak Hoeji* **40**(6), 684-689.
- Lee, I. S., Rhee, I. J. and Kim, K. T. (1997). Prediabetic in vitro model in pancreatic beta cells induced by streptozotocin. *Yakhak Hoeji* **41**(2), 260-267.
- Park, H. J. (1978). Synopsis of Golden Cabinet, Serhwadang.
- Rabinovitch, A. (1985). Pancreatic monolayer cultures-Preparation of purified islets cell cultures and assessment of beta cell replication. *IN Joseph L., Pohl S.L.(eds): Methods in Diabetes Research* Vol. 1, 310-314, A Wiely-Interscience Publication, New York.
- Johnstone, A., Thorpe, R. (1987). Immunoassays *In Immunochimistry in Practice* 2nd., Blackwell Scientific Publications, London, 246-254.
- Regazzi, R., Li, G., Deshusses, J. and Wolheim, C. B. (1990). Stimulus-Response Coupling in Insulin-secreting HIT Cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 15003-15009.
- Richardson, S. B., Eyler, N., Twente, S., Monaco, M. et al. (1990). Effects of Vasopressin on Insulin Secretion and Inositol Phosphate Production in a Hamster Beta Cell Line (HIT). *Endocrinol.* **126**, 1047-1053.
- Rho, Y. S., Hong, N. D., Kim, S. O. and Kim, N. J. (1984).

- Studies on the efficacy of combined preparation of crude drugs (XVIII)-The effect of Palmiwhan on the nephrogenous hypertention. *Kor. J. Pharmacogn.* **12**(4), 179-187.
- Rossini, A. A., Williams, R. M., Appel, M. C. and Like, A. A. (1980). In Irvine Animal W. J.(Ed): Models of Type 1 Diabetes *IN Immunology of Diabetes*. pp. 275-290, Teviot Scientific Publications, Edinburgh.
- Shin, J. Y. Rhee, I. J. (1994). The Effect of Palmiwon on the Streptozotocin induced diabetic rats. *J. Appl. Sci. Res. Ins. Hyosung.* **3**, 181-188.
- Varey, A. M., Lyduard, P. M., Dean, B. M., Van der Meide, P. H., Baird, J. D. and Cooke, A. (1988). Interferon- γ induces Class II MHC Antigens on RINm5F Cells. *Diabetes* **37**, 209-212.
- Winkel, M. V. and Pipeleers, D. (1986). Pancreatic B cells possess defense mechanism against cell-specific toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5267-5271.
- Yamahara, J., Hiroyuki, M., Sawada, T., Fujimura, H., Takino, S., Yoshikawa, M. and Kitakawa, I. (1981). Biologically active principles of crude drugs. Antidiabetic principles of Corni fructus in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi* **101**(1), 86-90.
- Zhang, H. J., Walseth, T. F. and Robertson, R. P. (1989). Insulin Secretion and cAMP Metabolism in HIT Cells. *Diabetes* **38**, 44-52.