

# 降糖補陰方이 자가면역 당뇨모델인 NOD mice의 혈당강하에 미치는 영향

송호철\* · 김성훈\*

경희대학교 동서의학대학원 중앙연구팀

## Effect of Kangdangboeumbang on the Anti-diabetic Activity in NOD Mice

Ho Cheol Song\*, Sung Hoon Kim\*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

This study was aimed to verify the anti-diabetic activity of Kangdangboeumbang(KBB) in NOD mice which is Insulin Dependent Diabetes Mellitus(IDDM). The reduction of blood glucose after oral administration between 14 weeks by 2 weeks period to a NOD mice in KBB extract treatment group was showed from 7 day after comparing with control group. KBB extract treatment group increased insulin secretion amount of serum than control group and decreased IFN- $\gamma$  production. The pancreatic  $\beta$ -cells is destroyed by Th1-dependent autoimmune disease in NOD mice. KBB extract treatment group intercepted the progress of edematous islet controlling inflammatory mononuclear cells of infiltration that also destruction of pancreatic  $\beta$ -cells electively in a NOD mice.

Key words : NOD(nonobese diabetic) mice, Kangdangboeumbang(降糖補陰方), IDDM

### 서 론

현대의학에서 당뇨병의 증상인 多飲 多食 多尿 등의 증상은 한의학에서 消渴의 범주에 속하고 있다. 消渴이란 消渴善飢하면서 渴而多飲하는 병증이다. 消는 燒로서 태운다는 뜻이며, 渴은 입이 마른다는 표현이다<sup>1)</sup>.

우리나라의 당뇨병 유병률은 30세이상 성인 연령의 약 7.2%가 당뇨병을 가지고 있는 것으로 보고되고 있어 당뇨병의 중요성이 갈수록 커지고 있다<sup>2)</sup>. 당뇨병은 크게 인슐린 의존성 당뇨(IDDM; Insulin Dependent Diabetes Mellitus)인 제1형 당뇨와 인슐린 비의존성 당뇨(NIDDM; Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus)인 제2형 당뇨로 대별되어 진다<sup>2,3)</sup>.

1형 당뇨병의 증상으로는 심각한 hyperglycemia, 체중감소, glycuria, 그리고 ketoacidosis 등을 들 수 있다. 이는 인슐린의 결핍에 기인하는데, 췌장의 Langerhans의 소도에 있는 인슐린

분비 세포인  $\beta$ 세포가 염증성 면역세포에 의해 선택적으로 파괴되기 때문이다<sup>4)</sup>.

IDDM은 self-tolerance 같은 정상적인 면역 조절 기능이 어떤 이유로 인하여 파괴 되고, 췌장의  $\beta$ 세포에 존재하는 자가항원에 대한 세포독성 T cell (Cytotoxic T cell : CTL) 이 생길 수 있고, 이 CTL을 통해 췌장의  $\beta$ 세포가 파괴되어 IDDM으로 발병할 수 있다. 즉 자가면역 질환으로 인슐린을 생산하는 췌장 소도의  $\beta$ 세포가 항진된 자가 면역 반응에 의해 파괴되는데 이에 는 대식 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 세포독성 사이토카인 관련되어 있다<sup>5,6)</sup>.

본 연구는 억제 CD4+ T 세포나 면역 억제 사이토카인을 저자가 당뇨병 치료에 활용중인 처방을 이용하여 활성화 시킨 후 소도 특이 면역 억제 반응을 유도하여 인슐린의존형 당뇨병을 예방할 수 있는 새로운 면역요법을 개발하기 위해 인슐린 의존형 당뇨병의 동물모델인 NOD 생쥐를 이용하였다. IDDM을 일으키는 세포독성 T cell (CTL)의 항원 수용체(TCR)에 대한 길항제를 한약처방을 이용하여  $\beta$ -cell specific CTL의 cytotoxicity를 down-regulation 및 제거함으로써 IDDM의 치료 효과를 관찰하고자 하였다.

\* 교신저자 : 송호철 · 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1 경희대학교 동서의학대학원 중앙연구팀

· E-mail : splow77@daum.net, sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2179

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

## 연구방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

본 실험을 위하여 사용된 C57bl/6와 NOD(nonobese diabetic) 생쥐는 모두 6주령 암컷으로 한국생명공학연구원에서 분양 받아 무균사육실(SPF)에서 무균 고형사료(삼양사)를 자유 식이하면서 멸균된 물을 충분히 공급하고 실온 23±2℃를 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 降糖補陰方의 1첩의 구성내용은 다음과 같다.(Table 1)

Table 1. Prescription of Kangdangboeumbang(KBB)

| 韓藥名 | 生藥名                                  | 用量(g) |
|-----|--------------------------------------|-------|
| 熟地黃 | <i>Rehmanniae Radix preparat</i>     | 12    |
| 玄參  | <i>Scrophularia Radix</i>            | 8     |
| 黃芪  | <i>Astragali Radix</i>               | 6     |
| 天花粉 | <i>Trichosanthis Radix</i>           | 6     |
| 山藥  | <i>Dioscoreae Rhizoma</i>            | 6     |
| 五加皮 | <i>Acanthopanax Cortex</i>           | 6     |
| 白僵蠶 | <i>Bombyx Bartycalus</i>             | 6     |
| 淫羊藿 | <i>Epimedi Herba</i>                 | 6     |
| 蟲芝  | <i>Ganoderma</i>                     | 6     |
| 鼠目太 | <i>Rhynchosia nulubilis</i>          | 6     |
| 曾木皮 | <i>Aralia elata Seemann</i>          | 6     |
| 海棠根 | <i>Chaenomeles Langerariae Radix</i> | 6     |
| 知母  | <i>Anemarrhenae Rhizoma</i>          | 4     |
| 黃柏  | <i>Phellodendri Cortex</i>           | 4     |
| 五味子 | <i>Schisandrae Fructus</i>           | 4     |
| 麥門冬 | <i>Ophiopogonis Radix</i>            | 4     |

#### 3) 시약 및 기기

Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)는 Sigma사(USA)제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Logan, USA)은 Hyclone사(Logan, USA) 제품을, insulin enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Sibayaki, Japan)과 IL-4, IFN- $\gamma$ 는 ELISA kit (R&D system, USA)으로 생산량을 측정하였다. 유세포 형광분석에 사용된 phycoerythrin(PE) -anti-mouse CD3, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD19, anti-mouse CD4-FITC, anti-mouse CD8-PE, 그리고 anti-mouse CD69-FITC는 Pharmingen사(Torreyana, U.S.A)의 제품을 사용하였으며, glucose 측정용 스트립은 Roche사(Germany) 제품을, 그리고 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 본 연구에 사용된 기기는 유세포분석기 (Cytometer, USA), 원심분리기(Hanil, Korea), Bio-freezer(sanyo, Japan), Accutrend GC (Roche, Germany), blood glucose meter(LifeScan, USA), ice-maker(vision 과학) 등의 것을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 제조

검액의 제조방법은 降糖補陰方(KBB) 3첩을 한약유출기(S-15000, 새일메디칼)에 넣고, 정제수(풀무원샘물) 2000ml과 같

이 혼합하여 3시간 달인다. 처음 30분간은 약 100℃에서 압력은 0.5kgf/cm<sup>2</sup>로 달이고, 2시간 30분간은 121℃에서 압력은 1.5kgf/cm<sup>2</sup>로 달이고 30분 간격으로 5회 압력밸브를 열어 압력을 1.0kgf/cm<sup>2</sup>이 될 때 까지 유출시킨 후 하여 압력밸브를 잠갔다. 3시간 동안 달인 후 KBB의 여과 추출액(약 1300ml)을 얻었고, 그중 500ml 만을 분리하여 연구에 사용하였다. KBB의 여과 추출액 500ml을 rotary vacuum evaporator (BUCHI, B-490, EYELA)에서 감압 농축하여 엑기스를 분리한 뒤 동결건조기(EYELA, FDU-540, JAPAN)에서 24시간 동결 건조하여 14g의 KBB의 추출물을 얻었다. 얻어진 분말은 초저온 냉동고(75℃)에서 보관하며 증류수에 희석하여 사용하였다.

#### 2) 식이와 검액의 투여

NOD 생쥐는 한 군을 5마리씩(n=5 mice/group)하여 일반 고형사료 1개군(대조군), KBB 투여군으로 나누었고, 정상군은 C57bl/6 생쥐로 하여(n=5) 14주 동안 자유식이 하였다. 한약검액 투여는 대조군과 실험군으로 나누어 대조군은 생리식염수를, 실험군은 KBB 추출물 30mg/kg을 증류수에 희석하여 12주간 매일 1회씩 경구투여 하였다.

#### 3) 혈액내 glucose 측정

8주후부터 2주 간격으로 꼬리 미정맥의 혈액을 소량 채취하여 blood glucose meter(LifeScan, USA)로 혈당량을 측정하였다.

#### 4) 혈청중 IL-4, IFN- $\gamma$ , 인슐린 분석

실험 종료후 (22주후) NOD 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장천자법으로 채혈한 후 혈청을 분리하여, IL-4, IFN- $\gamma$ , 그리고 인슐린의 혈청 함유량을 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, R&D system, USA)로 측정하였다. 각 well에 NOD 생쥐의 혈청 100 $\mu$ l (1/100 dilution)씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) 림프내 형광 유세포 분석

NOD 생쥐에서 림프절(Lymph node)을 분리하여 100mesh로 림프세포를 분리하였다. 분리된 림프세포에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-mouse CD3e, FITC-anti-mouse CD4, PE-anti-mouse CD8, 그리고 FITC-anti-mouse CD19를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3e+/CD19+ 그리고 CD4+/CD8+ 세포수를 백분율(%)로 분석하였다.

#### 6) 조직 병리 검사

췌장을 떼내어 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5 $\mu$ m의 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 massive mononuclear 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E)로 염색을 시행하였다.

## 실험성적

### 1. 혈당에 미치는 영향

NOD 생쥐는 췌장의 인슐린 분비 세포인  $\beta$ 세포가 염증성 면역세포에 의하여 선택적으로 파괴가 일어나 인슐린의 결핍을 초래하여 혈당이 올라가게 된다. 본 연구에서는 Fig. 1에서 보는 것 같이 8주령부터 KBB 추출물을 1일1회 경구투여하고, 2주간격으로 14주간(8주부터 22주까지) NOD 생쥐의 꼬리정맥에서  $20\mu\text{l}$ 의 전혈을 채혈하여 혈당량을 측정하였다. 그 결과 대조군의 NOD 생쥐의 혈당량은 지속적으로 증가하여 22주에는 혈당량이  $400\mu\text{g/ml}$  이상으로 증가하였다. 그리고 KBB 추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 혈당량 감소(50%)를 나타내었다( $p<0.001$ ).

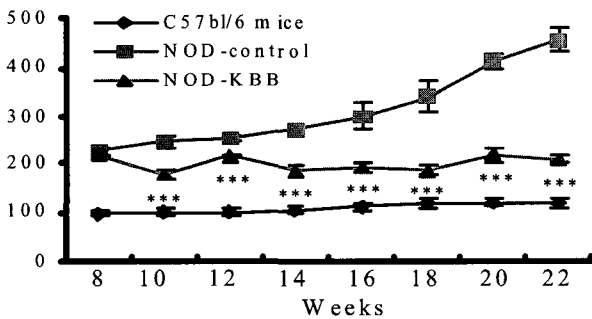


Fig. 1. Total glucose levels in females NOD mice. Whole Blood was collected from tail vein of NOD mice. Female NOD mice aged 8 weeks started to receive various concentration KBB extract oral administration. Total glucose have recently been point represents the mean $\pm$ SE of five mice. Statistically significant value compared with NOD-control data by T test (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ ).

### 2. 혈중 IL-4, IFN- $\gamma$ , 그리고 인슐린의 분비량에 미치는 영향

NOD 생쥐는 인슐린 의존성 당뇨 병태 모델로 Th1 계열 세포의 활성화로 췌장의  $\beta$ 세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 결핍으로 혈당조절이 되지 않아 발생하는 질환 모델이다. 실험결과 Table 2와 같이 KBB 추출물을 투여하고, 22주후 혈중 Th2 계열에서 분비되는 IL-4 생산량을 분석한 결과, 대조군 (NOD control)에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 IL-4 생산량의 증가를 관찰할 수 있었다. 그리고 Th1 계열에서 분비되는 IFN- $\gamma$  생산량을 분석한 결과, 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 50% 이상의 현저한 IFN- $\gamma$  생산량의 유의성 있는 감소를 관찰할 수 있었다( $p<0.01$ ). 또한 혈중 인슐린 분비량을 분석한 결과 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군이 3.8배로 유의성 있는 증가를 나타내어 KBB의 투여로 췌장의  $\beta$ 세포 파괴가 억제된 것으로 생각된다( $p<0.01$ ). CD4+ T 세포수 (Th 세포)는 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 감소하였고, 특히 CD4+ T 세포수가 14% 이상 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p<0.01$ ). 그리고 CD8+ T 세포수(Tc/s 세포)는 KBB 투여군에서 증가를 나타내었다. 특히 23% 이상 CD8+ T세포수가 크게 증가하였다.

### 3. 림프내 유세포수에 미치는 영향

NOD 생쥐에서의 당뇨병은 주로 T세포에 의해 중재되며

CD8+ 와 CD4+ T세포 모두 필요로 한다. 또한 NOD 생쥐에서의 자가면역 당뇨병은 CD4+ T 세포인 Th1 면역 반응에 일어난다. 본 연구에서는 22주 후 NOD 생쥐의 양쪽 하체등쪽에 존재하는 2개의 림프조직을 적출하여 림프세포를 분리한 후 유세포 형광 염색으로 면역세포의 수를 분석하였다. 그 결과 CD3+ T 세포수는 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 감소하였고 ( $p<0.05$ ), 그리고 CD19+ B세포수는 CD3+ T 세포에 비례하여 분포하는 경향이 있으므로 KBB 추출물 투여군에서 CD19+ B세포수가 증가하였다( $p<0.05$ ). CD4+ T 세포수 (Th 세포)는 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 감소하였고, 특히 CD4+ T 세포수가 14% 이상 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p<0.01$ ). 그리고 CD8+ T 세포수 (Tc/s 세포)는 KBB 추출물 투여군에서 증가를 나타내었다. 특히 23%이상 CD8+ T세포수가 증가하였다.

Table 2. Serum level of cytokine and insulin in mice (n=5/group at 14 weeks after start of the treatment)

|                             | C57bl/6        | NOD <sup>nl</sup> Control | NOD-KBB           |
|-----------------------------|----------------|---------------------------|-------------------|
| IL-4(pg/ml)                 | 9.1 $\pm$ 0.41 | 13.4 $\pm$ 1.1            | 14.7 $\pm$ 0.86   |
| IFN- $\gamma$ (pg/ml)       | 4.2 $\pm$ 0.20 | 45.2 $\pm$ 2.5            | 20.5 $\pm$ 2.1*** |
| Insulin( $\mu\text{g/ml}$ ) | 9.8 $\pm$ 0.4  | 3.8 $\pm$ 0.8             | 14.5 $\pm$ 3.3**  |

<sup>nl</sup>NON: Nonobese diabetic mice. Female NOD mice aged 8 weeks started to feed KBB extract by oral administration. Each point represents the mean SE of five mice. Statistically significant value compared with NOD-control data by T test(\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ ).

Table 3. Phenotype of lymph node in NOD mice (n=5/group at 14 weeks after start of the treatment)

| Phenotype         | C57bl/6         | NOD <sup>nl</sup> Control | NOD-KBB           |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-------------------|
| CD3+ (T cells)    | 70.9 $\pm$ 0.74 | 90.5 $\pm$ 0.50           | 87.6 $\pm$ 1.43*  |
| CD19+ (B cells)   | 27.3 $\pm$ 0.37 | 7.9 $\pm$ 0.02            | 11.3 $\pm$ 1.49*  |
| CD4+ (Th cells)   | 32.4 $\pm$ 2.76 | 63.4 $\pm$ 0.87           | 54.1 $\pm$ 2.23** |
| CD8+ (Tc/s cells) | 29.2 $\pm$ 1.45 | 25.8 $\pm$ 0.43           | 31.3 $\pm$ 4.15   |

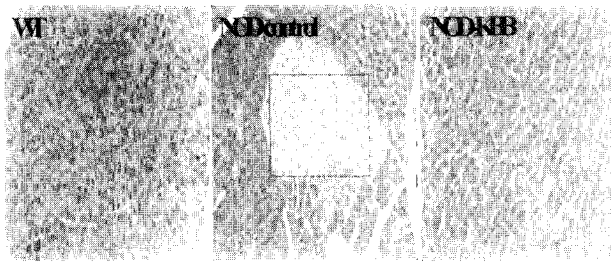
<sup>nl</sup>NON: Nonobese diabetic mice. At the end of the experiment, the mice lymph nodes were removed and CD19+/CD3e+ and CD4+/CD8+ cell population (%) were measured by flow cytometer. Each point represents the mean SE of five mice. Statistically significant value compared with NOD-control data by T test(\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ ).

### 4. 췌장조직의 인슐린염(insulinitis)의 측정

NOD 생쥐에서 췌장을 적출하여 조직염색을 실시하여 인슐린염의 정도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 것 같이 대조군에서는 C57bl/6 정상군 (wild type, WT)에 비하여 인슐린염(화살표)이 심하게 진행되어 T 임파구, B 임파구, 그리고 수지상세포가 침윤(infiltration)된 형태를 관찰할 수 있다. 즉, NOD 생쥐의 췌장 조직의 특징이 자가면역 당뇨병이 유발되면서 췌장에 큰 형태의 단핵세포(mononuclear cell)들이 침윤되어 있는 것을 볼 수 있었다. 그러나 KBB 추출물 투여군에서는 췌장에 T 임파구, B 임파구, 그리고 수지상세포 같은 단핵세포(mononuclear cell)의 침윤이 억제되어 인슐린염을 찾아 볼 수 없었다.

## 고찰

한의학에서 消渴의 범주인 당뇨병은 현대에 더욱 증가하고



**Fig. 2. Pancreatic histology insulinitis of an islet of Langerhans.** Lymphocytic infiltrates in this edematous islet suggests an autoimmune mechanism for this process. The destruction of the islets and an absolute lack of insulin. \*Arrow: Massive mononuclear cell

있어 중요성이 부각되고 있으며, 당뇨병 중에서 인슐린 의존형 당뇨병은 전체 당뇨병 환자의 5-10%를 차지하며, 급성으로 발병한다. 40대 이전에 발생하는데 주로 15세 미만에서 생기며 특히 5-7세, 10-14세에 잘 발생한다. 유전율은 10-25% 정도로 2형 당뇨병의 유전율인 30-60%에 비해 낮다. 증상은 三多증상인 多飲, 多食, 多尿가 뚜렷하고, 치료시에 인슐린이 필요하고, 당뇨병성 케톤산혈증에 빠지기 쉽다<sup>3,7)</sup>. 이에 비해 인슐린 비의존형 당뇨병은 40세 이후에 주로 발생하고 서서히 진행되어 三多 증상이 없거나 무증상인 경우가 많고, 비만인 경우가 많으며, 합병증으로는 망막증이 나타나기 쉽다<sup>7)</sup>.

저자는 임상에서 당뇨치료를 하면서 여러 가지 처방을 사용하고 있다. 그중에서도 下消 또는 그 증상이 體重減少, 視力減退, 口渴, 疲勞, 小便頻數, 성기능 저하(勃起不全) 등에 사용중인 降糖補陰方이 있다. 이는 熟地黃을 君藥으로 하여 腎精을 도우면서 滋陰清熱, 益氣하면서 혈당강화를 목적으로 사용중인 처방으로 저자가 직접 만든 것이다.

처방 구성 약물 중 熟地黃은 補陰藥으로 甘, 微溫하여 肝 腎經에 작용한다. 滋陰養血하고 生精益壽, 生骨하는 작용이 있다. 熟地黃은 甘潤하여 滋陰의 약효가 강하므로 消渴의 증후를 치료하는데, 특히 下消에 적용한다. 玄參은 清熱涼血藥으로 甘苦鹹하고 寒하여 瀉火解毒 滋腎養陰한다. 腎經에 들어가 腎水를 자양하고 浮游하는 火를 제압하는 清上撤下의 효능이 있다. 집토끼 피하에 玄參 추출물을 5g/kg의 표준으로 주사한 결과 혈당을 약간 낮춘다는 보고가 있었고, 이 효능은 生地黃이 玄參보다 더 뛰어난 것으로 보였다<sup>8)</sup>. 최 등<sup>9)</sup>은 streptozotocin유발 생쥐에서 玄參이 유의성있는 혈당강화를 보였다고 하였다. 黃芪는 補氣藥으로 甘溫으로 補脾益氣하면서 陽氣를 升舉시키는 작용이 있다. 消渴 증후에는 흔히 乏力, 口渴 등 氣津兩傷의 증상이 나타난다.

天花粉은 清熱瀉火藥으로 甘酸 微苦하고 寒涼하다. 甘酸으로 生津하고 苦寒으로 清肺하여 熱病傷津으로 인한 口渴煩燥, 消渴, 肺熱燥咳 등의 병증에 적용한다<sup>8)</sup>. 문<sup>10)</sup>이 家兔의 혈당강화를 한다고 하였다. 山藥은 補氣藥으로 甘平으로 작용이 溫和하여 寒하지도 熱하지도 않아 補氣하며 또한 養陰하여 脾陽, 脾陰을 모두 보한다. 肺腎을 보하고 收澀하여 脾虛泄瀉, 肺虛喘咳, 腎虛遺精, 帶下, 尿頻, 消渴 등의 병증을 치료한다. 五加皮는 祛風濕藥으로 辛苦溫하여 肝腎經에 작용하여 祛風除濕, 通絡止痛하고 強筋健骨한다. 痺症과 筋骨萎弱을 치료하는 要藥이다<sup>8)</sup>.

당뇨에 대해서는 가시오가피에 대한 혈당강화 연구가 있었다. 강 등<sup>11)</sup>의 가시오가피 약침, 정 등<sup>12)</sup>이 홍삼, 가시오가피, 동충하초 엑기스의 항당뇨작용에 대한 보고가 있었다. 白蠟蠶은 平肝熄風藥으로 鹹辛 平하여 肝 肺經에 작용하여 熄風止癢하고 化痰除濕한다. 소아의 驚風과 風熱頭痛, 中風口喎 등을 치료한다. 윤 등<sup>13)</sup>이 streptozotocin으로 유발한 당뇨병에 대한 백강잠이 혈당강화를 한다고 하였다. 淫羊藿은 補陽藥으로 辛甘하고 溫하여 甘溫으로 溫腎壯陽하고 腎溫으로 祛風除濕하여 腎陽을 強壯하여 強筋健骨하며, 風濕의 邪氣를 散邪하여 通痺止痛한다. 腎陰陽兩虛에는 仙茅 巴戟天 知母 黃柏 등과 배합하여 사용한다. 腎陽不足에 腎精虧損을 겸하면 단미를 오랫동안 복용하면 안되고, 熟地黃, 紫河車 등의 補血益精의 약물을 배합한다. 靈芝는 安神藥으로 甘淡하고 平하며 心脾經에 작용한다.

補氣養血하여 氣血不足, 脾胃虛弱의 증후, 止咳平喘하여 咳嗽哮喘, 養心安神하여 心神不安을 다스린다. 관상동맥경화증, 간염, 고지혈증, 고혈압 등에 치료작용이 있다고 보고되었다<sup>8)</sup>. 鼠目太는 여두, 쥐눈이콩 이라고도 하며, 콩과의 다년생 蔓草로, 三焦 중 中焦를 고르게 하고, 기를 내려서 모든 風熱을 억제하며, 맥이 막힌 것을 통하게 한다. 광물성 약재의 독을 비롯한 모든 독을 풀며, 혈액순환을 활발하게 한다. 죽으로 먹으면 당뇨병을 치료한다. 曾木皮는 두릅나무과의 낙엽활엽 관목인 두릅의 껍질을 말린 것이며, 민간에서는 열매와 뿌리를 해수, 위암, 당뇨병, 소화제에 사용하고, 당뇨병에 나무껍질이나 뿌리를 달여 먹는다<sup>14)</sup>. 김 등<sup>15)</sup>이 메탄올 엑기스, 각 분획의 혈당강화작용에 대한 연구가 있었다. 海業根은 장미과 낙엽소교목인 해당화 뿌리<sup>14)</sup> 문 등<sup>16)</sup>이 해당근 근부의 추출물에 대한 혈당강화작용에 대한 연구가 있었다. 知母는 清熱瀉火藥으로 苦甘, 寒하며 肺, 胃, 腎經에 작용한다. 苦寒은 清熱하고 甘寒은 滋陰潤燥한다. 肺胃의 燥熱로 津液이 상하여 咽乾 증상이나 消渴引飲에 天花粉, 五味子, 黃芪 등을 배합하는 玉液湯이 있다. 물추출물은 정상 토끼의 혈당을 낮추는데, alloxan 당뇨병 토끼에 대한 작용이 보다 뚜렷하다<sup>8)</sup>. 최 등<sup>9)</sup>은 streptozotocin유발 생쥐에서 知母가 유의성있는 혈당강화를 보였다고 하였다. 黃柏은 清熱燥濕藥으로 苦寒하여 沈降하여 清熱燥濕, 解毒하여 腎經相火를 瀉하고 下焦의 濕熱을 제거한다. 腎陰을 견고히 하고, 相火를 제압하여 虛熱을 물리치므로 陰虛發熱, 骨蒸盜汗 등에 知母 黃芪 龜板 등의 滋養腎陰의 약물을 배합하여 사용된다. 麥門冬은 補陰藥으로 甘微苦하고 微寒하여 肺, 心, 胃經에 작용한다 이는 養陰生津, 潤燥하여 咳血, 乾嗽燥痰, 心煩口燥 등에 사용된다. 五味子是 收澀藥으로 肺氣를 收斂하고 腎陰을 滋養한다. 肺虛喘咳, 腎虛인한 遺精消精, 陽虛自汗, 陰虛盜汗, 久瀉不止, 津枯口渴 등 肺腎의 精氣가 상하였거나 氣精이 모두 傷한 증상을 치료한다<sup>8)</sup>. 이 등<sup>17)</sup>이 물추출물에 대한 alloxan유발 당뇨 억제효과 연구가 있었고, 고 등<sup>18)</sup>이 五味子 추출물에 대한 혈당강화 연구가 있었다.

인슐린 의존성 당뇨병에 대한 동물모델은 alloxan유발 당뇨, streptozotocin유발 당뇨와 NOD 생쥐를 이용한 당뇨실험이 있다. Alloxan과 STZ로 유발된 당뇨병은 순수한 1형 당뇨병 모델이라고는 할 수 없으나, alloxan유발 당뇨연구로 송<sup>19)</sup>의 六味地黃

湯加山藥, 정 등<sup>20</sup>)의 누에 등이 있고, STZ유발 당뇨연구로 최 등<sup>9</sup>)의 수종한약(黃柏, 知母, 玄參, 蘆薈, 生地黃, 地骨皮, 梔子), 박 등<sup>21</sup>)의 수종생약(茯苓, 澤瀉, 麥芽, 梔子, 黃芪, 牡丹皮, 地黃), 윤<sup>13</sup>)이 白殭蠶) 박 등<sup>22</sup>)의 백삼, 홍삼, 화기삼등 인삼종류, 정 등<sup>23</sup>)의 冬蟲夏草 등의 다수의 연구가 있었다.

NOD 생쥐는 제1형 당뇨병의 매우 훌륭한 동물모델이다<sup>24</sup>). NOD 생쥐는 자발적으로 당뇨병이 발생하고, 특히 female (80-90%)이 male(40-50%)보다 약 2배정도 발병 빈도가 높다. Female NOD 생쥐는 생후 4주 정도에 인슐린염(islets)으로의 면역세포의 침투)가 생기고, 약 14-17주 정도가 되면 고혈당의 증세를 보이기 시작하여 35-40주에는 대부분의 생쥐가 심각한 당뇨증세를 보이고 인슐린 치료가 없다면 결국은 죽게 된다. NOD 생쥐에서의 당뇨병은 주로 T 세포에 의해 중재되며 CD8+ 와 CD4+ T 세포 모두 필요로 한다. NOD 생쥐에서의 자가면역 당뇨병은 Th1 면역 반응에 일어난다<sup>25</sup>). 예전의 많은 보고에 따르면, 염증성의 Th1 면역반응을 Th2 면역반응으로 바꾸게 하는 여러 가지 조치가 자가면역반응을 효과적으로 억제하는 것을 보여 준다. 흥선에서 T 임파구가 성숙될 때, 자기 자신이 항원(self antigen)을 강하게 인식하는 경우는 제거되고, 항원에 상대적으로 약하게 결합된 경우는 양성적으로 선택된다<sup>26</sup>). 또한 자가반응성 T 세포는 말초 혈액의 관용기전(tolerance mechanism)에 의하여 그 레퍼토리가 제한된다. 이들 자기 방어기전이 실패한다면 이것이 곧 자가면역 질병(autoimmune disease)의 조건이 되는 것이다.

IDDM은 이와 같이 self-tolerance 같은 정상적인 면역 조절 기능이 어떤 이유로 인하여 파괴되고, 췌장의 β세포에 존재하는 자가항원에 대한 세포독성 T cell (Cytotoxic T cell : CTL) 이 생길 수 있고, 이 CTL을 통해 췌장의 베타세포가 파괴되어 IDDM으로 발병할 수 있다<sup>27</sup>). 즉 자가면역 질환으로서 인슐린을 생산하는 췌장 소도의 베타세포가 항진된 자가 면역 반응에 의해 파괴되는데 이에 는 대식 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 세포독성 cytokine과 관련되어 있다<sup>28</sup>). CD4+ T세포는 보조 T세포(helper T cell, Th세포)로서 이들 Th세포는 B세포의 항체 생산을 보조하고(Th2), 감염된 대식세포의 활성화를 돕는다(Th1). 이러한 작용은 직접 세포-세포간 상호 결합에 의해서 또는 cytokine의 분비를 통해서 이루어진다<sup>29,30,31</sup>). 세포증식의 다음 단계는 분화(differentiation)인데, 분화란 세포의 기능이 결정 지워지는 단계이다. 즉, 활성화된 Th 세포는 그들이 분비하는 cytokine의 종류와 분비한 cytokine에 의한 면역 조절기능에 따라 Th1과 Th2, 두 종류의 효력 T세포(effector CD4+ T cell)로 분화하게 된다<sup>32,33</sup>). 이러한 분화의 기전은 완전하게 밝혀지지는 않았지만, 일차 분화시기에 주위의 cytokine 환경이 매우 중요하며, 항원의 종류와 용량, 항원제시세포의 종류, 항원제시세포와 T 세포 반응 할 때 보조자극 신호의 종류 등에 의해 Th1 혹은 Th2 로의 세포 분화가 결정된다고 알려져 있다<sup>34,35,36</sup>). 이렇게 분화된 효력 Th1 세포는 IFN-γ, IL-12와 같은 Th type 1 cytokine (proinflammatory cytokine)을 생산하여 박테리아 감염과 같은 intracellular pathogen에 대항하는 면역반응에 관여한다. 한편 이들의 과도한

발현은 자가면역 질환을 초래하기도 한다<sup>37</sup>). 이와는 달리 효력 Th2 세포는 IL-4, 5, 9, 10, 13 등과 같은 Th type 2 cytokine (anti-inflammatory cytokine)을 생산하여 기생충과 같은 extracellular parasite의 감염에 대항하고, B 세포와 함께 체액성 면역반응(humoral immunity)에 관여한다<sup>38</sup>). 이처럼 Th1 세포가 생산하는 Th type 1 cytokine은 Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 Th type 2 cytokine은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반면 Th1 세포의 분화를 억제하는 식으로 서로 상호견제를 통해 균형을 이루며 Th1 과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러가지 면역질환을 겪게 된다<sup>39</sup>). 최근의 연구에서 NOD 당뇨생쥐는 Th type 1 중재형 자가면역 질환으로 혈중 IFN-γ의 함유량이 정상적인 생쥐에 비하여 10배 이상 높게 유지되고 있고, IL-4는 감소되어있고, 인슐린 함유량도 10μU/ml 이하로 존재하고, 혈중 glucose가 400μg/ml 이상인 생쥐에 FTY720을 투여하여 당뇨억제에 효과가 있다고 보고하고 있다<sup>40</sup>).

본 연구에서도 14주 동안 NOD 당뇨 생쥐에 KBB 추출물을 투여하여 IFN-γ의 혈중 함유량을 대조군에 비하여 54.6% 감소시켰고, 혈중 인슐린 함유량은 대조군에 비하여 276% 증가시켰다. IFN-γ 생산량의 현저한 감소는 Th1 의존성 자가면역 질환 NOD 생쥐의 Th1 계열세포에 의한 β세포 파괴가 차단되었고, 이로 인해 인슐린의 혈중 분비량이 증가된 것으로 보인다. 그리고 Th2 계열에서 분비되는 혈청중 IL-4 생산량은 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 증가하였는데, 이는 KBB의 투여로 Th2 계열 세포의 활성화가 된 것으로 보인다. 이러한 결과는 KBB의 투여로 Th1 계열의 세포활성이 억제되고 Th2 계열의 활성화가 되는 면역조절기능을 하는 것으로 사료된다.

혈당량은 대조군은 22주에는 혈당량이 400μg/ml 이상으로 증가하였으나, KBB 추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 혈당량 감소(50%)를 나타내어, 혈중 혈당량이 크게 감소되어 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 보인다. NOD 생쥐에서 췌장의 β세포를 선택적으로 파괴하는 염증면역 단핵세포들은 2차 림프조직인 lymph node에서 순환된 임파구 세포들로 췌장에 인슐린염으로의 진행을 하게되어 염증을 유발하게 된다. 정상 생쥐의 lymph node에서 T 임파구와 B 임파구의 비율은 7:3으로 알려져 있다<sup>41</sup>). 본 연구에서 NOD 당뇨생쥐의 T 임파구와 B 임파구의 비율은 9:0.79로 관찰되었고 KBB 추출물을 투여한 실험군은 8.7:1.1로 개선되었다. CD4와 CD8의 비율도 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군에서 개선된 결과를 관찰할 수 있었다.

췌장으로 침윤된 염증면역단핵세포들에 의하여 인슐린염이 유발되어 β세포가 파괴되는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서도 KBB 추출물 투여군에서 대조군에 비하여 현저히 췌장에 인슐린염이 억제되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 KBB 추출물이 NOD 생쥐에서 췌장의 β세포를 선택적으로 파괴하는 염증면역단핵세포의 침윤을 억제하여 인슐린염으로의 진행을 차단하는 효과로 인하여 혈중 혈당량이 감소되어 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

자가면역 당뇨병 모델인 NOD 생쥐에 降糖補陰方(KBB)을 투여한 후 혈당강하효과를 알아보기 위하여 NOD 생쥐에 2주간격으로 14주간 KBB 추출물을 경구투여한 후 혈당의 변화를 측정하고, KBB 추출물 투여군에서 대조군과 비교하여 투여 7일 후부터 통계적으로 유의성 있는 혈당강하효과가 관찰되었다. 또한 혈청중 인슐린 분비량을 분석한 결과, 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군이 유의성 있는 현저한 증가를 나타내어 KBB의 투여로 췌장의 β세포 파괴가 억제된 것으로 관찰되었다. 그리고 IFN-γ 생산량은 대조군에 비하여 KBB 추출물 투여군이 현저한 감소를 나타내었다. 이는 Th1 의존성 자가면역 질환 생쥐인 NOD 생쥐에서 Th1 계열세포에 의한 β세포 파괴가 차단되어 인슐린의 혈중 분비량이 증가되고, 또한 NOD 생쥐에서 췌장의 β세포를 선택적으로 파괴하는 염증면역단핵세포의 침윤을 억제하여 인슐린염으로의 진행을 차단하는 효과로 인하여 혈중 혈당량이 감소되어 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 두호경: 동의신계학(하), 서울, 동양의학연구원, p.1131,1139, 1142, 1993.
2. 이기엽: 한국인 당뇨병의 특성, 당뇨병소식, 1(1), p.2,3, 대한당뇨병학회, 1995.
3. 이대열: 소아당뇨병, 당뇨병소식, 1(1), p.7-9, 대한당뇨병학회, 1993.
4. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L.: The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med.*, Sep;7(9), pp.1052-1056, 2001.
5. Castano L, Eisenbarth GS: Type-1 diabetes; a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Ann Rev Immunol* 8, pp.647-679, 1990.
6. Liblau GS, Singer SM, McDewitt HO: Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ specific autoimmune diseases, *Immunol Today* 16, pp.34-38, 1995.
7. 박경수: 당뇨병복사전, 서울, 이채, pp.56-58, 2004.
8. 서부일, 최호영: 임상한방본초학, 서울, 영림사, pp.186-188, 217, 218, 233, 234, 858, 859, 876, 878, 933, 934, 2004.
9. 최해운, 정태영 외: streptozotocin 유발 당뇨병에서 수종의 한약재가 혈당강화에 미치는 영향, *대한본초학회지*, 18(2), pp.121-128, 2003
10. 문석재: 천화분 Extract 의 가토혈당 농도에 미치는 영향에 관한 연구, *동서의학*, 7(1), pp.38-44, 1982.
11. 강성길 외: 가시오가피추출이 당뇨병유발억제 및 신장보호활성에 미치는 영향, *대한침구학회지*, 20(3), pp.1-5 대한침구

- 학회, 2003.
12. 정성현, 최용의 외: 홍삼, 가시오가피, 동충하초 혼합수엑스의 항당뇨작용, *한국생약학회지*, 33(4), pp.337-343, 2002.
13. 윤수홍, 하현: Streptozotocin 으로 유발한 당뇨병에 대한 백강잠의 영향, *한국위생과학회지*, 6(1), pp.11-22, 2000.
14. naver 백과사전: www.naver.com
15. 김옥경, 이은방: 두릅나무 근피의 혈당강하 성분에 관한 연구 (1) - MeOH 엑스 및 분획물의 혈당강하작용, *한국생약학회지*, 24(3), pp.213-218, 1999.
16. 문성필, 전기업: 해당화 근부의 추출성분(제1보)-혈당강하 활성 구분의 검색, *한국목재공업회*, 1996년발표논문집, 1(1), p.130-136, 1996.
17. 이성우, 이정숙: 오미자 열매의 불추출물이 Alloxan-induced diabetic rats 에 미치는 효과, *한국식생활문화학회지*, 5(2), pp.259-264, 1990.
18. 고병섭, 최미경 외: 오미자 추출물의 혈당 강하 효과에 관한 연구, *한국응용생명화학회지*, 47(2), pp.258-265, 2004.
19. 송효정: 육미지황탕가 산약이 Alloxan 당뇨병 백서의 혈당 및 혈청변화에 미치는 영향, *경희의학*, 8(4), 경희대학교 경희의료원, pp. 388-399, 1992.
20. 정성현 외: 누에 분말에 의한 Alloxan 유발 고혈당 mouse 의 혈당강하 효능, *한국삼사학회 40회 정기총회 및 학술대회*, 경희대학교 동서약학연구소, 연구업적집, 1997.
21. 박정일 외: 수종생약의 혈당강하작용, *생약학회지*, 28(2) pp. 72-74, 1997.
22. 박경수 외: Multiple low dose streptozotocin으로 유도된 당뇨병 흰쥐에서 백삼, 홍삼, 화기삼의 항당뇨 활성 비교, *고려인삼학회지*, 27(2), pp.56-61, 2003
23. 정기화, 정춘식: streptozotocin 유발 당뇨병 흰쥐에서 Cordyceps militaris와 Paecilomyces japonicus의 항당뇨 효과, *식품위생안전성학회지*, 17(4), pp.210-216, 2002.
24. D.D. Pinschewer, A.F. Ochsenein, B. Odermatt, V. Brinkmann, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel: FTY720 immunosuppression impairs effector T-cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory, *J. Immunol*, 164, pp.5761-5770, 2000.
25. H. Tedesco, B. Kahan, G. Mourad, Y. Vanrenterghem, J. Grinyo, W. Weimar, P. Pellet, L. Chodoff, T. Sablinski: FTY720 combined with neural and corticosteroids is effective and safe in prevention of acute rejection in renal allograft recipients (interim data), *Am. J. Trans.* 1, p.243, 2001.
26. K. Budde, R.L. Schmouder, R. Brunkhorst, B. Nashan, P.W. Lucker, T. Mayer, S. Choudhury, C. Skerjanec, G. Kraus, H.H. Neumayer: First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, pp.1073-1083, 2003.
27. Z. Nikolova, A. Hof, M. Rudin, Y. Baumlin, G. Kraus, R.P. Hof: Prevention of graft vessel disease by combined

- FTY720 and Cyclosporin A treatment in the DA to Lewis rat carotid artery transplantation model, *Transplantation* 69, pp.2525-2530, 2000.
28. M.W. Hwang, A. Matsumori, Y. Furukawa, K. Ono, M. Okada, A. Iwasaki, M. Hara, S. Sasayama: FTY720, a new immunosuppressant, promotes long term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery diseases in a murine model of cardiac transplantation, *Circulation* 100, pp.1322-1329, 1999.
  29. T. Yamaski, K. Inoue, H. Hayashi, Y. Gu, H. Setoyama, J. Ida, W. Cui, Y. Kawakami, M. Kogire, M. Imamura: Effect of a new immunosuppressive agent, FTY720, on survival of islet allografts, *Cell Transplant.* 7, pp.403-406, 1998.
  30. F. Fu, S. Hu, J. Deleo, S. Li, C. Hopf, J. Hoover, S. Wang, V. Brinkmann, P. Lake, V. Shi: Longterm islet graft survival in STZ and autoimmune induced diabetes models by immunosuppressive and potential insulinotropic agent FTY720, *Transplantation* 73, pp.1425-1430, 2002.
  31. H. Kitabayashi, M. Isobe, N. Watanabe, J. Suzuki, Y. Yazaki, M. Sekiguchi, FTY720 prevents development of experimental autoimmune myocarditis through reduction of circulating lymphocytes, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, pp.410-416, 2000.
  32. S. Kurose, E. Ikeda, M. Tokiwa, N. Hikita, M. Mochizuki: Effects of FTY720, a novel immunosuppressant, on experimental autoimmune uveoretinitis in rats, *Exp. Eye Res.* 70, pp.7-10, 2000.
  33. H. Okazaki, D. Hirata, T. Kamimura, H. Sato, M. Iwamoto, T. Yoshio, J. Masuyama, A. Fujimura, E. Kobayashi, S. Kano, et al: Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice: therapeutic potential in systemic lupus erythematosus, *J. Rheumatol.* 29, pp.707-716, 2002.
  34. V. Brinkmann, K.R. Lynch: FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity, *Curr. Opin. Immunol.* 14, pp.569-575, 2002.
  35. V. Brinkmann, S. Chen, L. Feng, D.D. Pinschewer, Z. Nikolova, R. Hof: FTY720 alters lymphocyte homing and protects allografts without inducing general immunosuppression, *Transplant. Proc.* 33, pp.530-531, 2001.
  36. R. Tisch, H. McDevitt: Insulin dependent diabetes mellitus, *Cell* 85, pp.291-297, 1996.
  37. Z. Yang, M. Chen, R. Wu, L.B. Fialkow, J.S. Bromberg, M. McDuffie, A. Naji, J.L. Nadler: Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer, *J. Immunol.* 168, pp.6479-6485, 2002.
  38. Z. Yang, M. Chen Wu, R. McDuffie, J.L. Nadler: The anti-inflammatory compound lisofylline prevents Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice, *Diabetologia* 45, pp.1307-1314, 2002.
  39. T.W. Kay, I.L. Campbell, L.C. Harrison: Characterization of pancreatic T lymphocytes associated with cell destruction in the nonobese diabetic (NOD) mice, *J. Autoimmun.* 4, pp.263-276, 1991.
  40. Zandong Yang,<sup>a</sup> Meng Chen,<sup>a</sup> Lawrence B. Fialkow, Justin D. Ellett, Runpei Wu, Volker Brinkmann,<sup>b</sup> Jerry L. Nadler, and Kevin R. Lynch: The immune modulator FTY720 prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice *Clinical Immunology* 107, pp.30-35, 2003.
  41. D.V. Serreze, H.D. Chapman, D.S. Varnum, M.S. Hanson, P.C. Reifsnyder, S.D. Richard, S. Fleming, E.H. Leiter, L.D. Shultz: B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes; analysis of a new "speed congenic" stock of NOD, Ig mu null mice, *J. Exp. Med.* 184, pp.2049-2053, 1996.