

원 저

# 고혈당 흰쥐에서 蟾螬의 혈당 조절과 항산화 작용에 관한 연구

이철웅, 정지천, 신현철<sup>1)</sup>

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 대구한의대학교 한의과대학 내과학교실<sup>1)</sup>

## Effects of the Extract in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Cheol-Woong Lee, Ji-Cheon Jeong, Hyeon-Cheol Shin<sup>1)</sup>

Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Daegu-hanny University<sup>1)</sup>

**Objectives :** Etiological studies of diabetes and its complications showed that oxidative stress might play a major role. Therefore, many efforts have been tried to regulate oxygen free radicals for treating diabetes and its complications. Because *Holotrichia* has been known to be effective for the treatment of diabetes, the methanol extract of *Holotrichia* was tested for its effectiveness in reducing the oxidative stress induced by streptozotocin.

**Methods :** *Holotrichia* was washed, dried in the shade and crushed. The crushed *Holotrichia* was extracted 3 times, each time with 3 volumes of methyl alcohol at 60°C for 24 h. The extract was filtered and evaporated under a reduced pressure using a rotary evaporator to yield 17 g. *Holotrichia* extract was oral-administered to the diabetic rats induced by streptozotocin 50 mg per 1 kg of body weight for 20 days. The efficacy of the *Holotrichia* extract was examined with regard to the enzymatic pathways involved in the oxygen free radical production and the glutathione balance.

**Results :** The Effects of the methanol extract of *Holotrichia* in streptozotocin-induced diabetic rats with regards to body weight, blood glucose level, hepatic lipid peroxide level, hepatic superoxide anion radical content, hepatic xanthine oxidase activity and type conversion rate, hepatic glutathione level, hepatic aldose reductase activity, and hepatic sorbitol dehydrogenase activity were shown to be good enough to cure and prevent the diabetes and its complications.

**Conclusions :** These results indicated that *Holotrichia* might reduce the oxidative stress in the tissues and organs by regulating the production of oxygen free radicals. Especially, *Holotrichia* might prevent and cure the diabetes and its complications by reducing the oxidative stress in the  $\beta$ -cells of pancreas.

Some suggestions on biophoton experiments were made.

**Key Words:** *Holotrichia*, diabetes, streptozotocin, aldose reductase, sorbitol dehydrogenase

## 緒 論

· 접수 : 2005년 9월 6일 · 논문심사 : 2005년 11월 28일  
· 채택 : 2005년 12월 27일  
· 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1 동국대학교  
경주한방병원 내과  
(Tel:054-770-1254, Fax:054-770-1500  
E-mail:jjcjh@paran.com)

당뇨병은 췌장에서의 인슐린 분비 부족이나 분비된 인슐린의 작용 결함으로 인하여 초래되는 만성 대사성 질환으로 전 세계 인구의 4-5%를 차지하고 있다. 적절한 치료가 이루어지지 않고 오랜 기간 동안 방치될 경우 많은 합병증을 야기할 수 있으며 특

히 말초혈관 병변에 의한 혈류 장애는 거의 모든 장기에 병변을 유발시키는데 눈, 신경, 신장, 심장 등에 나타나는 합병증이 크게 문제시되고 있다<sup>1,2)</sup>. 또한 임상 연구 보고에 의하면 당뇨병 환자의 경우 체내에 과산화지질의 농도가 상대적으로 높다고 하였다<sup>3)</sup>.

당뇨병 합병증의 발병 기전은 여러 가지 인자가 관여하고 있는데 가장 주목받는 대표적인 발병 인자 중의 하나로 oxidative stress를 들 수 있다<sup>4-6)</sup>. Oxidative stress는 활성이 강하고 친핵성의 경향이 높아 조직이나 세포에 치명적인 영향을 줄 수 있는 oxygen free radical에 의해서 나타나는 일종의 독성 반응이다<sup>6)</sup>. 고혈당 상태가 지속되면 비정상적인 당 대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 한층 가속화시킨다<sup>6,7)</sup>. 또한 췌장의  $\beta$ -cell 파괴 과정에 oxygen free radical이 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 그러므로 oxygen free radical들을 효율적으로 조절할 수 있는 방법을 찾아내어 당뇨병을 극복하려는 시도가 임상에서 많이 이루어지고 있다.

東洋醫學에서 당뇨병은 消渴의 범주에 속하는데, 陰津이 虧損되고 燥熱이 内生하는 것을 기본 病因으로 하며 清熱生津止渴 및 滋陰 등의 治法이 기본적으로 활용되고 있다<sup>9,10)</sup>. 그런데 당뇨병의 혈관 및 신경 합병증이 유발되는 데는 瘀血이 관여하므로<sup>11,12)</sup> 活血化癥 치료도 응용되고 있다. 王<sup>13)</sup>에 의하면 당뇨병 과정 중에 oxygen free radical이 많이 발생하므로 치료에 이를 소거시키는 약물이 필요하다고 하였다.

消渴의 치료에 활용되는 한약제와 처방들에 대한 실험적 연구는 많이 보고되었으나 혈당, insulin 및 혈청 중 효소들의 변화 또는 췌장  $\beta$ -cell의 조직학적인 변화를 살펴본 것이 대부분이다<sup>14)</sup>. 그런데 당뇨병의 합병증 발생에 관여하는 oxidative stress에 대한 연구는 보이지 않는다.

鱘螬(*Holotrichia Diomphalia* Bates)는 풍뎅이의 幼蟲인 굼벵이를 乾燥한 것으로서 破血行瘀·散結消腫 등의 효능으로 惡血, 瘀血痞氣, 青翳白膜, 月閉, 浮腫 및 破傷風 등의 치료에 활용되어 왔다<sup>15,16)</sup>. 임상

에서 당뇨병의 치료에 많이 활용되고 있는 처방인 珍糖元<sup>17)</sup>의 주된 약물로서, 실험 연구에 의하면 당 대사와 당 운반 및 인산화에 관여하여<sup>18)</sup> 당뇨병 치료에 효과를 나타내는 것으로 보고되었다. 그밖에도 鱘螬는 항혈전 효과<sup>19,20)</sup>가 있으며, 활성 산소들에 의해 유발된 신장, 뇌 조직의 손상에 대하여 항산화 효과와 관련하여 회복 효과가 있다고 보고된 바 있다<sup>21,22)</sup>.

이에 저자는 鱘螬의 活血化癥 효능이 당뇨병 합병증의 치료에 유효할 것으로 생각되어 oxidative stress와 관련하여 효과를 나타내는지를 검토하고자 streptozotocin으로 당뇨병을 유도한 흰쥐에서 간장 조직 중의 oxygen free radical 생성계 효소 및 glutathione을 매개하는 소거 기구와 관련된 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 약제

鱘螬(*Holotrichia Diomphalia* Bates)를 시중에서 상 등품을 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 2) 동물

일정한 온도와 습도가 유지되는 조건에서 사육된 체중 200 g 내외의 외관상 건강한 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

Albumin bovine, cytochrome C, EDTA sodium salt, hippuryl-histidyl-L-leucine, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH), N-1-methylnicotinamide (NMN), trichloroacetic acid (TCA), o-dianisidine, trisma base, glutathione (reduced and oxidized form), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, thiobarbituric acid (TBA), sodium dodecyl sulfate, dithiothreitol, DL-3-hydroxy-3-

methylglutaryl CoA, hexadecyltrimethyl ammonium bromide, triethanolamine, 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), xanthine sodium salt 등의 시약은 Sigma사로부터 구입하였으며 조제된 kit 시약은 모두 Eiken사로부터 구입하여 사용하였고 기타 본 실험을 수행하는 중에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 일급 내지는 특급품을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

蟾蜍 200 g을 물로 깨끗하게 세척하고 음건한 다음 잘게 분쇄하였다. 여기에 3배량의 methanol 용액을 가하여 60 °C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시킨 다음 여지로 여과하여 회전감압기를 사용하여 농축 건조시켜 蟾蜍추출물 17 g (수율 8.5%)을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2) 당뇨병 유도 및 검액 투여

실험동물은 정상군, 당뇨병 유도군, 당뇨병 유도 후 蟾蜍 처리군 등 3군으로 나누었으며, 각 군에 10 마리씩 배정하였다. 당뇨병은 citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 streptozotocin 용액 60 mg/kg을 복강내로 주입하여 유도하였으며, 정상군은 동량의 생리식염수를 주사하였다. 당뇨병 발생은 streptozotocin 주입 3일 후부터 urine strip으로 확인하였고, 시료인 蟾蜍추출물은 실험동물의 체중 kg 당 50 mg을 20일간 경구로 투여하였다. 실험동물은 도살 전 16시간 동안 물만 섭취케 하고 절식시켰다.

### 3) 효소원의 조제

실험동물을 ether를 사용하여 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부대동맥을 통해서 혈액을 채취한 다음 간 조직을 적출하였다. 적출한 간 조직을 생리식염수로 씻은 다음 이물질 및 생리식염수를 제거하였다. 간 조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로 약함)를 가하여 병냉 하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 과산화지질 및 glutathione 함량 측정원으로 사용하였다. 한편 마쇄

균질액을 다시 10,000 × G에서 20분간 원심분리하여 상징액을 얻었으며 이 상징액을 이용하여 xanthine oxidase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 실온에서 약 1시간 정도 방치시켜 혈청을 분리시키고 이 혈청을 glucose 함량 측정 시료로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4 °C에서 행하였다

### 4) 효소 활성 측정

#### ① Aldose reductase 활성 측정

Aldose reductase 활성 측정은 Yamaoka 등의 방법<sup>23)</sup>을 약간 변경하여 일정량의 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 용액에 2 mM NADPH와 200 mM DL-glyceraldehyde 및 효소원을 첨가하여 25 °C에서 5분간 반응시키는 동안에 DL-glyceraldehyde를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성도를 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

#### ② Sorbitol dehydrogenase 활성 측정

Sorbitol dehydrogenase 활성 측정은 Hollmann 등의 방법<sup>24)</sup>에 준하여 일정량의 (0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.6) 용액에 기질인 105 mM D-fructose, 0.2 mM NADH 및 효소원을 첨가하여 25 °C에서 5분간 반응시키는 동안에 D-fructose를 환원시키는데 소비된 NADH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

#### ③ Xanthine oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase (type O) 활성 측정은 Stürpe 등의 방법<sup>25)</sup>에 준해 0.1 M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60 μM 및 효소원을 첨가하여 37 °C에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase (type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD<sup>+</sup> 100 mM을 첨가해 동일하게 반응

시킨 다음 측정하여 나온 활성도 (total type: type D+O) 에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine 산화 효소의 형 전환 비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine 산화 효소 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 형 전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

④ Glutathione peroxidase 활성 측정

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Paglia 등의 방법<sup>26)</sup>에 준해 일정량의 0.1 M Tris · HCl buffer (pH 7.2) 용액에 기질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM glutathione, glutathione reductase (2 I.U.), 0.2 mM NADPH 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 생성되는 GSSG를 환원시키는데 소비된 NADPH의 함량을 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 나타내었다.

⑤ Glutathione reductase 활성 측정

Glutathione reductase 활성 측정은 Meiz와 Langdon 등의 방법<sup>27)</sup>에 준하여 27mM EDTA와 16.3 mM GSSG가 함유된 0.1M Tris HCl buffer (pH 8.0) 용액 일정량에 6 mM NADPH를 기질로 하여 효소액을 가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 GSH를 생성시키는데 소비된 NADPH의 함량을 파장 340 nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 나타내었다.

5) 혈중 glucose 함량 측정

혈액 중의 glucose 함량 측정은 Thomason 등의 방법<sup>28)</sup>에 따라 조제된 kit 시약을 이용하여 실시하였다. 혈청 일정량에 발색 시액 3.0 ml를 가한 다음 잘 혼합한 후 37℃에서 일정시간 반응시켰다. 이 반응액을 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 준하여 함량을 측정하였다.

6) 과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법<sup>29)</sup>에 준

해 간조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95 ℃에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 단백 1mg당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

7) Glutathione 함량 측정

간 조직 중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법<sup>30)</sup>에 준해 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상정액 일정량에 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하여 함량을 산정하였다. GSH 함량은 단백질 1mg당 함유되어 있는 GSH의 양을 nmole로 나타내었다.

8) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법<sup>31)</sup>에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다.

9) 통계 처리

실험 성적의 유의성 검증은 student *t*-test를 행하였으며, *p*-value가 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

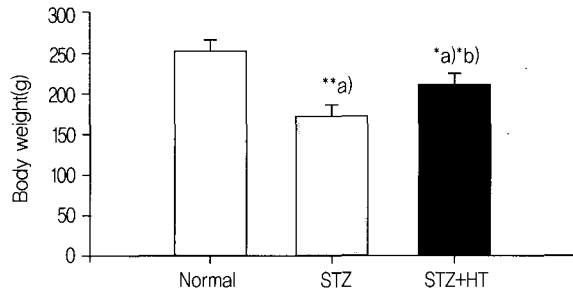
## 結 果

1. 체중에 미치는 영향

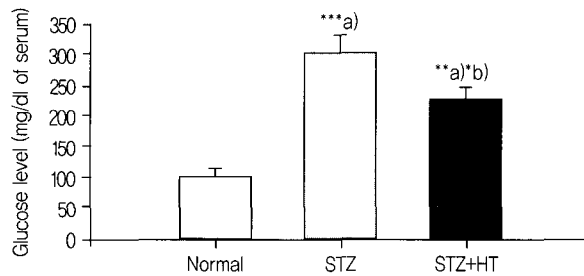
정상군의 체중이 254.3±12.8 g이었으나 streptozotocin 주입에 의해 당뇨병을 유도한 대조군은 170.3±11.7 g으로서 정상동물에 비해 약 32% 정도 현저하게 감소되었다. 그러나 streptozotocin 주입 후 鱉蠟추출물을 투여한 실험군에서는 209.5±11.9 g으로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 1).

2. 혈중 glucose 함량에 미치는 영향

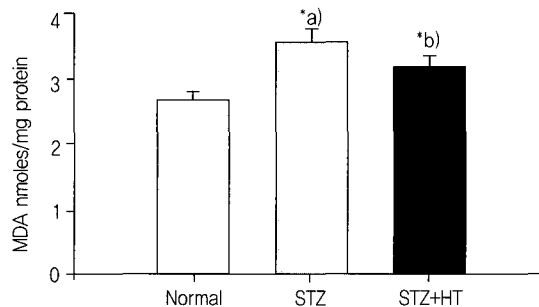
정상군의 혈중 glucose 함량이 103.5±9.8 mg/dl 인



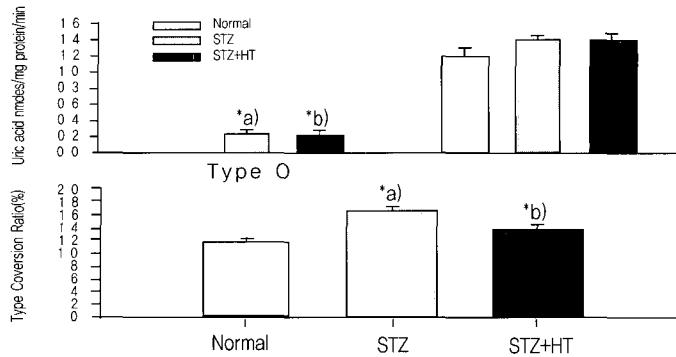
**Fig. 1.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the body weight in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.



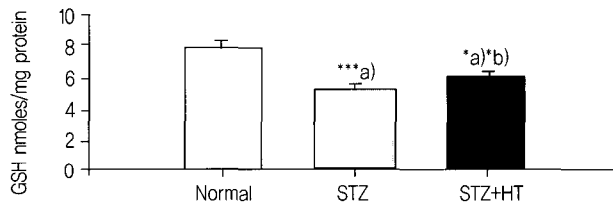
**Fig. 2.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.



**Fig. 3.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic lipid peroxide level in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*:  $p < 0.05$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.



**Fig. 4.** Effects of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic xanthine oxidase activity and type conversion rate in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*: $p < 0.05$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.



**Fig. 5.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic glutathione level in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*: $p < 0.05$ , \*\*: $p < 0.01$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.

데 비하여 대조군은  $304.7 \pm 28.5$  mg/dl로 정상군에 비해 현저하게 증가되었다. 반면 실험군에서는  $226.1 \pm 22.3$  mg/dl으로서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 2).

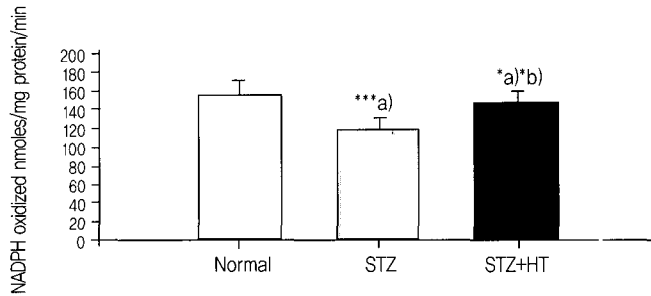
### 3. 간장중 과산화지질 함량에 미치는 영향

정상군에서는 간장중 과산화지질의 함량이  $2.66 \pm 0.18$  nmoles이었으나 대조군은  $3.59 \pm 0.21$  nmoles로 35% 정도 현저하게 증가되었다. 반면 실험군에서는  $3.22 \pm 0.14$  nmoles로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 3).

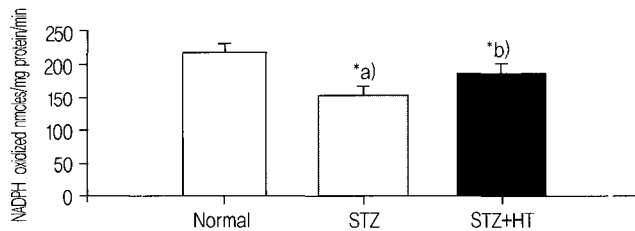
### 4. Xanthine oxidase 활성 및 형 전환에 미치는 영향

정상군의 xanthine oxidase 활성은 type O (oxidase)의 경우  $0.14 \pm 0.02$  nmoles이었다. 그러나 대조군에서는  $0.23 \pm 0.02$  nmoles로서 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 반면 실험군에서는  $0.19 \pm 0.02$  nmoles로서 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다. Type D+O (oxidase-dehydrogenase)의 경우는 정상군, 대조군, 실험군에서 활성의 변화를 관찰할 수 없었다.

Xanthine oxidase 형 전환비는 정상군이  $11.5 \pm 0.7\%$ 인데 비하여 대조군에서는  $16.4 \pm 0.9\%$ 로 약 43% 정도 현저하게 증가되었으나, 실험군에서는



**Fig. 6.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic glutathione peroxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*; $p < 0.05$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.



**Fig. 7.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic glutathione reductase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*; $p < 0.05$ ). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.

13.6  $\pm$  0.8%로서 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 4).

#### 5. Glutathione 함량에 미치는 영향

정상군에서는 glutathione 함량이 7.75  $\pm$  0.42 nmoles이었으나 대조군에서는 5.08  $\pm$  0.34 nmoles로 유의성 있게 감소되었다. 반면 실험군에서는 5.92  $\pm$  0.40 nmoles로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 5).

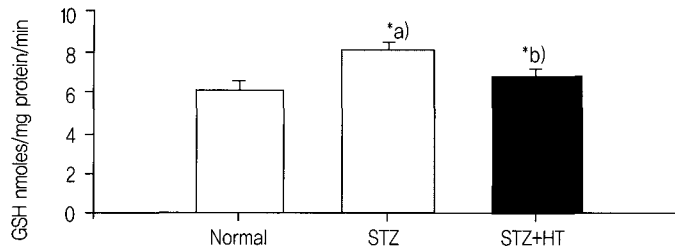
#### 6. Glutathione peroxidase 활성에 미치는 영향

정상군의 간장중 glutathione peroxidase 활성이 158.6  $\pm$  14.2 nmoles인데 비하여 대조군에서는 118.4

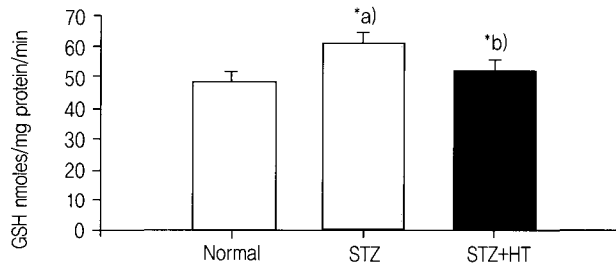
$\pm$  12.0 nmoles로서 유의성 있게 억제되었다. 반면 실험군에서는 149.4  $\pm$  11.5 nmoles로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 6).

7. Glutathione reductase 활성에 미치는 영향  
정상군의 간장중 glutathione reductase 활성이 217.1  $\pm$  14.3 nmoles이었으나 대조군에서는 154.9  $\pm$  13.0 nmoles로 정상군에 비하여 약 29% 정도 현저한 억제 현상을 관찰할 수 있었다. 반면 실험군에서는 188.3  $\pm$  13.6 nmoles로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 7).

#### 8. Aldose reductase 활성에 미치는 영향



**Fig. 8.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic aldose reductase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*: $p$ <0.05). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.



**Fig. 9.** Effect of the methanol extract of *Holotrichia* (HT) on the hepatic sorbitol dehydrogenase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  SE for 10 animals. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from streptozotocin induced diabetic animals (\*: $p$ <0.05). STZ : Streptozotocin-treated group, HT : *Holotrichia* methanol extract-treated group.

정상군의 간장중 aldose reductase 활성은  $6.15 \pm 0.39$  nmoles이었으나 대조군에서는  $7.92 \pm 0.45$  nmoles로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가되었다. 반면 실험군에서는  $6.82 \pm 0.40$  nmoles로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 8).

9. Sorbitol dehydrogenase 활성에 미치는 영향  
정상군의 간장중 sorbitol dehydrogenase 활성이  $48.7 \pm 3.49$  nmoles이었으나 대조군에서는  $60.4 \pm 3.60$  nmoles로 정상군에 비하여 현저하게 증가되었다. 반면 실험군에서는  $52.1 \pm 3.51$  nmoles로 유의성 있게

억제되었다 (Fig. 9).

### 考 察

消渴의 病因에 대하여 <血證論><sup>32)</sup>에 “血瘀在裏則口渴 所以然者 血與氣本不相離 內有瘀血 故氣不得通 不能載水津上升 是以發渴 名曰血渴 瘀血去則不渴矣”라고 하였다. 또한 消渴이 오래 되어 陰陽이 모두 虛損되면 津液이 耗傷되어 正氣가 더욱 虛弱해지고 따라서 推動이 無力해져 血行이 遲滯되고 瘀血을 이루게 되는데, 이것이 당뇨병의 혈관 및 신경



합병증을 유발하게 된다<sup>11,12</sup>). 그러므로 血瘀는 消渴의 주요한 病因의 하나이다<sup>11</sup>).

蟾蜍는 性溫 味鹹하고 肝經에 歸經하며 主로 瘀血을 治療하는 藥物로 사용되어 왔다<sup>15,16</sup>). 임상에서 당뇨병의 치료에 많이 활용되고 있는 처방인 珍糖元의 주된 약물로서, 실험 연구에 의하면 당 대사와 당 운반 및 인산화에 관여하는 glucokinase와 hexokinase 활성을 증가시켜 당뇨병 치료에 효과를 나타내는 것으로 보고하였다<sup>18</sup>). 또한 강한 血栓 溶解 活性을 가지고 있고<sup>19,20</sup>) 활성산소를 억제하는 항산화 효과가 있으므로<sup>21,22</sup>) 당뇨병 합병증의 치료에 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

정상적인 체내 대사과정이나 외부에서 섭취한 xenobiotics의 산화반응 과정이 진행되는 동안 생체는 반드시 부산물을 생성시킨다. 체내에서 산화반응이 진행되는 동안 파생되는 대표적인 부산물로 oxygen free radical을 들 수 있는데 이는 순환기계 질환이나 당뇨병, 동맥경화 같은 대사성 질환을 유발시키는 중요한 인자 중의 하나로 알려져 있다<sup>33</sup>). 또한 당뇨병과 그 합병증의 유발에 oxygen free radical이 밀접하게 관련이 있다는 많은 연구 보고가 있다<sup>7,8</sup>). 따라서 저자는 蟾蜍가 oxygen free radical과 관련하여 당뇨병 합병증의 예방과 치료에 효과를 나타내는지를 검토하고자 하였다.

일반적으로 당뇨병이 유발된 상태에서는 비효소적 당단백화, 단당류의 자가산화, 대사성 스트레스, sorbitol 경로 활성도의 변화, 항산화 방어 기전의 약화 등이 생기며 이때 나타나는 병태생리적 반응이 oxygen free radical의 증가와 관련된다고 알려져 있다<sup>34,35</sup>). 본 실험에서는 蟾蜍의 당뇨병 합병증 치료 효과를 검토하는 방법으로 oxygen free radical의 생성과 소거에 관여하는 효소들의 반응 양상과, 당뇨병의 합병증에 중대한 영향을 미치는 당의 비정상적 대사 경로인 polyol pathway의 지표가 되는 두 가지 효소인 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase의 활성<sup>36,37</sup>) 변화를 조사하였다.

먼저 흰쥐에 streptozotocin을 주입한 후 혈당치의 변화를 관찰하여 당뇨병 모델동물을 선정하였다.

Streptozotocin은 체내에서 췌장의  $\beta$ -cell을 파괴하여 insulin의 생성과 분비 기능을 저하시켜 혈당을 상승시키는 작용을 하는 약물이다<sup>38</sup>).

흰쥐에 streptozotocin을 주입한 경우에 현저한 체중 감소 현상이 관찰되었으나 蟾蜍추출물의 투여로 정상 수준 가깝게 증가되었다. 혈당 변화에서도 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 증가하던 혈중 glucose 함량이 蟾蜍추출물의 투여로 정상수준으로 회복되었다. 또한 streptozotocin에 의한 고혈당 상태에서 간조직 중의 xanthine oxidase 활성과 과산화 지질의 생성이 현저하게 증가하였으나 蟾蜍추출물의 투여로 인해서 정상 수준으로 억제되었다.

Xanthine oxidase는 기질을 산화시킬 때 기질의 전자를 분자상태의 산소가 수용하게 되는 생화학적 반응을 촉매하므로 활성산소의 생성을 증가시켜 streptozotocin-induced oxidative stress를 유발하는데 관여하고 있다<sup>39</sup>). 蟾蜍추출물은 이 효소의 활성을 억제시킴으로서 oxygen free radical의 생성을 저하시켜, 이로 인한 조직 손상을 감소시킴으로서 과산화 지질의 생성이 억제되었을 것으로 생각되며 따라서 당뇨병의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

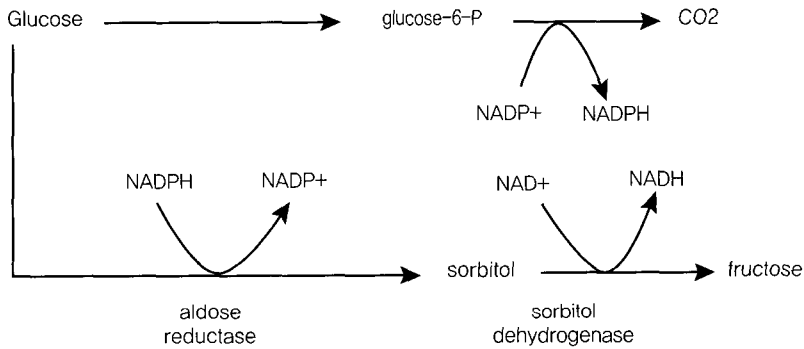
Glutathione은 주로 간에서 생합성되어 전신에 널리 분포하는데, 여러 가지 생화학적 반응에 필수적인 물질이며 oxygen free radical의 소거에도 밀접하게 관여하고 있다<sup>40</sup>). Streptozotocin 주입에 의해 현저하게 감소하던 간조직 중의 glutathione 함량이 蟾蜍추출물 투여에 의해 정상 수준으로 회복되었다. Glutathione 함량 감소 효과와 xanthine oxidase 활성 증가 현상이 서로 밀접한 관계를 갖고 있음을 감안해 보면 이러한 실험성적은 매우 흥미 있는 결과라고 생각된다.

한편 glutathione을 매개로 하는 glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성도 streptozotocin 주입에 의해 유의성 있게 억제되었으나 蟾蜍추출물의 투여로 인해서 정상 수준 가깝게 회복됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 성적으로 보아 고혈당 상태에서 glycation 현상이 진행되는 과정에서는 활성산소류의 생성이 증가될 뿐만 아니라 이

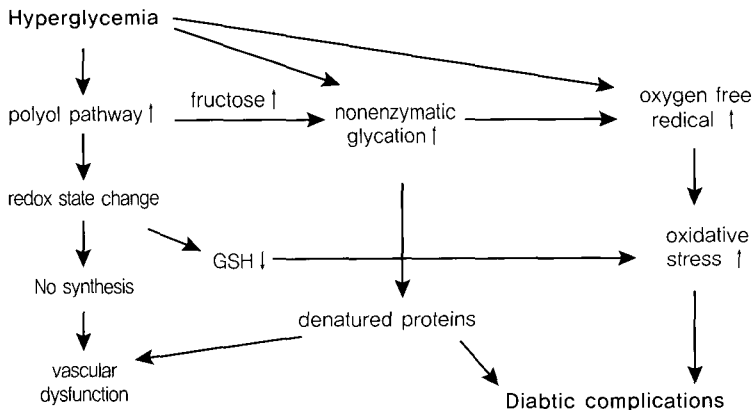
들의 소거 효과가 약화되어 생체 세포가 쉽게 손상을 받는 악순환이 이어질 것으로 생각되며, 蟻螬추출물이 생체 방어기구에 크게 관여하고 있는 glutathione의 활용을 증진시켜 조직 세포를 보호하는 기능을 가지고 있음을 나타내고 있다.

일반적으로 고혈당 상태가 체내에서 지속되면 당뇨병의 복잡한 합병증과 밀접한 관련이 있는 비정상적인 당대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 야기시키는데, 이 polyol

pathway는 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase에 의해서 반응이 이루어지게 된다 (Scheme 1,2,36,37). 당뇨병 모델 동물에서 두 효소 모두 활성이 현저하게 증가하였으나 蟻螬추출물의 투여로 인해 정상 수준 가깝게 조절되고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 蟻螬추출물이 두 효소의 활성을 억제하여 polyol pathway의 비정상적인 작동을 정상적으로 조절해 줌으로서 oxidative stress로 인한 체장 조직의 손상을 억제시키고 궁극적으로는 당뇨병의 발현을 억제시



Scheme 1. Polyol pathway



Scheme 2. Putative factors involved in the pathogenesis of diabetic complications

킬 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과들을 종합하여 볼 때 蟻螬추출물은 체내에서 oxygen free radical의 생성계와 소거계에 관여하는 효소들의 활성을 조절하여 oxidative stress를 감소시킬 수 있을 것으로 생각되며, 이는 췌장의  $\beta$ -cell에도 영향을 미쳐 조직 손상을 억제시켜 당뇨병의 발현을 억제시킬 것으로 사료된다. 또한 해독기구를 활성화시켜 활성산소에 의한 조직 손상을 경감시켜 줄 수 있을 뿐만 아니라 oxidative stress로 인해서 나타날 수 있는 수많은 난치성 질환의 예방에도 효과가 있을 것으로 생각된다.

### 結 論

蟻螬가 oxidative stress와 관련하여 당뇨병의 예방과 치료에 효과를 나타내는지를 검토하고자 streptozotocin으로 당뇨병을 유도한 흰쥐를 대상으로 간장 조직 중의 oxygen free radical 생성계 효소 및 glutathione을 매개하는 소거 기구와 관련된 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. Streptozotocin 주입에 의해 체중이 현저하게 감소되고 혈중 glucose 함량이 현저하게 증가되었으나 蟻螬추출물의 투여로 유의성 있게 회복되었다. 과산화지질의 함량, xanthine oxidase 활성 및 형 전환비가 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 증가되었으나 蟻螬추출물의 투여로 유의성 있게 감소되었다. Streptozotocin 주입에 의해 현저하게 억제되었던 glutathione 함량과 glutathione peroxidase 및 glutathione reductase 활성이 蟻螬추출물의 투여로 정상 수준으로 회복되었다. Aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성이 streptozotocin 주입에 의해 현저하게 증가되었으나 蟻螬추출물의 투여로 유의성 있게 억제되었다. 이러한 실험 결과는 蟻螬가 oxygen free radical의 생성계와 소거계에 관여하는 효소들의 활성을 조절하여 oxidative stress를 감소시킬 수 있을 것으로 생각되며, 이는 췌장의  $\beta$ -cell에도 영향을 미쳐 조직 손상을 억제시켜 당뇨병의 발현을 억제시킬 것으로 생각된다.

### 參考文獻

1. Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 1985;34:145-60.
2. 김용진 외. 당뇨병학. 서울:고려의학. 1998: 391-468.
3. Barry H. Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB J.* 1987;1:358- 63.
4. Godin GV and Wohaiab SA. Reactive oxygen radical processes in diabetes, In *Oxygen Radicals in the Pathophysiology of Heart Disease.* Singa PK, ed. Boston:MA, Kluwer. 1988.
5. Oberly LW. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biol Med.* 1988;5:113-24.
6. Wolff SP. The potential role of oxidative stress in diabetes and its complications : Novel implication for theory and therapy in diabetic complications, *Scientific and Clinical Aspects.* Crabbe MJC, ed. NY:ChurchilLivingstone. 1987:167-220.
7. Pryor WA. Free radicals in biology in "Involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis in medical chemistry" Amsterdam: Elsevier..1977:331-61.
8. Helgason T and Jonasson MR. Evidence for a food additive as a course of ketosis-prone diabetes. *Lancet.* 1981;2:716-20.
9. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1986:477.
10. 余永譜. 中醫治療內分泌代謝疾病. 浙江:浙江科學技術出版社. 1992:239,243.
11. 張德蘊. 糖尿病綜合治療與康復. 北京:中國中醫藥出版社. 1996:15,114-5.
12. 林 蘭. 糖尿病的中西醫結合論治. 北京:北京科學技術出版社. 1992:31-2.
13. 王作成. 中醫中藥對糖尿病自由基代謝的影響. *天津中醫.* 1995;12:43-4.
14. 김영기, 임종국. 당뇨병의 실험 문헌적 고찰. *동국한의학연구소 논문집.* 1999;7:27-46.

15. 李時珍. 本草綱目, 서울:高文社. 1975:1300.
16. 李尙仁. 本草學. 서울:醫藥社. 1983:471.
17. 오승환. 당뇨병 치험례. 대한한의학회지. 1987;8:24-8.
18. Kim sang Kyoon. A study on the effect of *Holotrichia* on the streptozotocin-induced diabetes in mouse. Thesis of Master's degree: Dongguk University Graduate School. 1999.
19. 文成煥, 高炳熙, 宋一炳. 血栓症에 미치는 蟾蜍의 효능에 관한 실험적 연구. 경희의학. 1992;8:177-81.
20. 홍시내, 정지천, 김철호. 蟾蜍의 혈전 용해 효소 분리 및 그 특성에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 1999;20:198-209.
21. 文相元, 鄭智天. 蟾蜍가 oxidant에 의한 신장 조직 손상에 미치는 효과. 한방성인병학회지. 1997;3:93-100.
22. 윤종영, 박종혁, 민건우, 윤철호, 정지천, 신억섭. 蟾蜍가 초산납으로 유발한 흰쥐의 뇌독성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22:321-30
23. Yamaoka T, Nishimura C, Yamashita K, Itakura M, Yamada T, Fujimoto J and Kokai Y. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia*. 1995;38:255-61.
24. Hollmann S. In Hoppe-Seyler Thieffelder : *Handbuch der physiol. und path.-chem.* Vol. VIa. Berlin-Heidelberg-New York:Analyse, Springer. 1964:704.
25. Stirpe F and Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase: to Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) oxidase (type O). *J Biol Chem*. 1969;244:3855-63.
26. Paglia ED and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70: 158-69.
27. Meiz CE and Langdon RG. Hepatic glutathione reductase : I. Purification and general kinetic properties. *J Biol Chem*. 1962;237:1589.
28. Thomson RH. Colorimetric glucose oxidase method for blood glucose. *Clin Chem Acta*. 1966;13:133-5.
29. Ohkawa H, Ohishi N and Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-8.
30. Ellmann GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82:70-7.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
32. 唐容川. 血證論. 上海:上海人民出版社. 1977:87.
33. Michelson AM. Oxygen radicals. *Agents Actions*. 1982;11:179-210.
34. Granger DN and Parks DA. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. *The Physiologist*. 1983;26:159-64.
35. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Masuoka S, Ohishi N and Yaki K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med*. 1979;21:104-7.
36. Pugliese G, Tilton GT and Williamson JR. Glucose-induced metabolic imbalance in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev*. 1991;7:35-59.
37. Stevens MJ, Dananberg J, Feldman EL, Lattimer SA, Kamijo M, Thomas TP, Shindo H, Sima AA and Greene DA. The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and Na-K-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. *J Clin Invest*. 1994;94:853-9.
38. Schein P, Kahn R, Gorden P, Wells S and Devita VT. Streptozotocin for malignant insulinomas and carcinoid tumors. *Arch Intern Med*. 1973;132:

- 555-61.
39. Battelli MG, Lorenzoni E and Stirpe F. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase) : Purificatio, interconversion and some properties. *Biochem J.* 1973;131:191-8.
40. Chasseud LF. Distribution of enzymes that catalyze reactions of glutathione with  $\alpha,\beta$ -unsaturated compounds. *Biochem J.* 1973;131:756-69.