

# 清血散이 ob/ob mouse의 혈당, 고지혈증, Polyol Pathway 및 Reactive Oxygen Species에 미치는 영향

한상태 · 정지천\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

## Effects of *Cheonghyul-san* on Blood Glucose, Hyperlipidemia, Polyol Pathway and Reactive Oxygen Species in ob/ob Mice

Sang Tae Park, Ji Cheon Jeong\*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Etiological studies of diabetes and its complications showed that oxidative stress might play a major role. Therefore, many efforts have been tried to regulate free oxygen radicals for treating diabetes and its complications. *Cheonghyul-san* has been known to be effective for the antidiabetic, antihyperlipidemic and antiobesitic prescription, and composed of four crude herbs. In male ob/ob mouse with severe obesity, hyperinsulinemia, hyperglycemia, hyperlipidemia, the acting mechanisms of *Cheonghyul-san* were examined. Mice were grouped and treated for 5 weeks as follows. Both the lean (C57/BL6J black mice) and diabetic (ob/ob mice) control groups received standard chow. The experimental groups were fed with a diet of chow supplemented with 7.5, 15 and 30 mg *Cheonghyul-san* per 1 kg of body weight for 14 days. The effects of *Cheonghyul-san* extract on the ob/ob mice were observed by measuring the serum levels of glucose, insulin, lipid components, and the kidney levels of reactive oxygen species (ROS), MDA+HAE, GSH and also the enzyme activities involved in polyol pathway. *Cheonghyul-san* lowered the levels of serum glucose and insulin in a dose dependent manner. Total cholesterol, triglyceride and free fatty acid levels were decreased, while the HDL-cholesterol level was increased, in *Cheonghyul-san* treated groups. Renal aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activities were increased in the ob/ob mice, whereas those were inhibited in the *Cheonghyul-san*-administered groups. *Cheonghyul-san* inhibited the generation of ROS in the kidney. Finally, MDA+HAE level was increased and the GSH level was decreased in the ob/ob mice, whereas those were improved in the *Cheonghyul-san*-administered groups. The results suggested that *Cheonghyul-san* exerted the antidiabetic and antihyperlipidemic activities by regulating the activities of polyol pathway enzymes, scavenging ROS, regulating the MDA+HAE and GSH levels in the ob/ob mice.

Key words : *Cheonghyul-san*, ob/ob mouse, antidiabetic activities, hyperlipidemia, polyol Pathway

### 서 론

당뇨병은 고혈당 및 이에 수반되는 대사 장애를 특징으로 하는 질환군으로 췌장의  $\beta$  cell의 선택적인 파괴로 인해 인슐린의 절대적인 결핍 상태인 제1형 당뇨병 (Type 1 : insulin dependent diabetes mellitus, IDDM, 인슐린 의존형) 및 인슐린

저항성과 이에 따른 인슐린의 상대적 결핍을 나타내는 제2형 당뇨병 (Type 2 : non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM, 인슐린 비의존형)으로 분류된다<sup>1-3</sup>.

인슐린은 여러 신호 전달체계를 통해 포도당의 대사, 지방과 단백질의 대사, 세포의 분화 및 성장 등에 관여한다. 그러므로 인슐린 저항성이 발생하면 단순히 당대사의 이상만을 초래하는 것이 아니라 여러 조직에 다양한 영향을 미치게 되는데<sup>4</sup>, 특히 고혈당, 고인슐린혈증, 지질 대사 이상 등과 함께 혈관 평활근세포의 과도한 이동과 증식을 일으켜 동맥경화를 촉진한다<sup>4,5</sup>. 인슐린

\* 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1, 동국대 경주한방병원 2내과

· E-mail : jjch@paran.com, · Tel : 054-770-1265

· 접수 : 2008/01/16 · 채택 : 2008/02/04

저항성은 유전적인 요인과 함께 말초조직에서 인슐린 감수성을 감소시키는 식이 형태나 비만, 운동 부족, 스트레스 등의 생활과도 밀접한 관련이 있는 병리 상태이다<sup>2,6-8)</sup>.

최근의 연구에 의하면 당뇨병 환자와 당뇨병 실험동물에서 반응성 산소유리기 (reactive oxygen species, ROS)의 생성이 증가되어 있고, 증가된 반응성산소유리기가 혈관의 인슐린 저항성을 유발하고 이 과정에서 혈관세포의 증식 이상과 관련된 세포내 신호전달 체계가 활성화되어 당뇨병성 혈관합병증이 발생할 것으로 추측되고 있다<sup>9,10)</sup>. 고혈당이 만성적으로 지속되면 ROS의 생성이 증가되는데, 이들은 반응성이 강하고 친핵성의 경향이 뛰어나 oxidative stress를 야기하여 조직이나 세포에 치명적인 영향을 준다<sup>11)</sup>.

oxidative stress를 한층 가속화시키는 비정상적인 당 대사과정으로 polyol pathway가 있는데, 인산화 과정 없이 포도당을 이용하는 경로로서 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase에 의해 반응이 이루어진다. 이 과정에 의해 세포 내에 과당(fructose)이 축적되어 각종 합병증이 진행된다<sup>2,12,13)</sup>.

東洋醫學에서 당뇨병은 消渴의 범주에 속하는데, 陰津虧損으로 燥熱内生하는 것을 기본 病機로 하며 淸熱生津 止渴 滋陰 등의 治法이 활용되고 있다<sup>14,15)</sup>. 消渴이 오래되거나 誤治할 경우에 腦疽, 背瘡, 中滿, 鼓脹, 癰疽, 水病 및 失明 등의 消渴傳變證이 발생하는데 당뇨병의 만성 합병증과 유사하다<sup>16)</sup>. 실험연구에 의하면 順氣散<sup>17)</sup> 및 竹瀝과 누에가루 배합약물<sup>18)</sup>이 각각 ob/ob mouse와 db/db mouse의 혈당을 저하시키고, 珍糖元<sup>19)</sup>, 螞蟥<sup>20)</sup> 등이 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase 활성을 억제시키는 것으로 보고되었다.

淸血散은 임상 경험을 통해 당뇨병과 고지혈증 및 비만의 치료에 효과적인 약물들을 선정하여 개발중인 처방이다. 榆根皮 (Ulmus davidiana), 龍膽草 (Gentianae Scabrae Radix), 山藥 (Dioscoreae Radix), 滑石 (Talcum) 등으로 구성되어 淸熱, 祛濕, 利水, 止渴, 滋陰 등의 효능으로 고지혈증, 당뇨병 및 그 합병증의 예방과 치료에 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

본 연구에서는 淸血散이 2형 당뇨병 동물 모델인 유전적 고혈당 비만 마우스 (ob/ob mouse)에서 혈당 및 혈청지질, polyol pathway에 관여하는 효소의 활성, ROS 생성, 과산화지질 및 glutathione 함량 등에 미치는 영향 등을 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

淸血散의 구성 약재는 시중에서 구입하고 정선하여 사용하였으며, 1첩 분량은 다음과 같다(Table 1).

#### 2) 시약 및 기기

시약은 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, sodium dodesyl sulfate (SDS)는 Bio-Rad (Hercules, USA), sulfosalicylic acid,

glutathione, lowry reagent등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였으며, 기기는 GENios (GENios-basic, Tecan, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였다.

#### 3) 동물

생후 5주령된 체중 30 g 내외의 외관상 건강한 수컷 ob/ob mouse와 C57BL/6J mouse (중앙실험동물, 서울, 한국)를 7일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 22°C 내외, 습도는 50%로 유지하고 light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, mouse용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

Table 1. Composition and Contents of Chunghyul-san

韓藥名	생약명	중량
榆根皮	Ulmus davidiana	8 g
龍膽草	Gentianae Scabrae Radix	7 g
山藥	Dioscoreae Radix	5 g
滑石	Talcum	3 g
Total Amount		23 g

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 淸血散 460 g에 3배 량의 95% methanol을 가하고 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 66.34 g (수율 14.42%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 실험군 및 검액 투여

실험동물은 C57 mouse로 정상 대조군, ob/ob mouse로 당뇨병 대조군, ob/ob mouse에 淸血散추출물 7.5, 15, 30 mg/kg을 투여한 실험군 등 5군으로 나누었으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 검액은 사료에 섞어 14일간 투여하였다.

#### 3) 생체 시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 심장에서 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 glucose, insulin 등의 측정원으로 사용하였고, 신장을 채취하여 생리 식염수로 잘 씻어내고 Whatman 여과지로 식염수를 제거한 후 -70°C에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 신장 조직의 일부에 4배 용량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 병냉 하에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 600 × g에서 10분간 원심분리하고, 상층액은 8,000 × g에서 다시 20분간 원심분리하여 침전물인 mitochondria층을 분리하였으며 이를 제거한 상층액을 취하여 ROS 및 GSH 등의 측정을 위한 시료로 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 0~4°C에서 실시하였다.

#### 4) Glucose 함량 측정

혈청중 glucose 함량은 Thomason 등의 방법<sup>21)</sup>에 따라 조제된 시약 kit (아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에

효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. glucose 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 mg으로 나타내었다.

5) Insulin 함량 측정

혈청중 insulin 함량은 anti-insulin이 coated된 96 well plate가 포함되어 있는 시약 kit (Shibayagi Co., Ltd.)를 사용하여 정량하였다. 96 well plate를 washing buffer로 씻어주고 biotin conjugated anti insulin과 혈청을 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 씻어주고 HRP conjugated streptavidin solution을 넣어 30분간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 씻어주고 substrate chromogen reagent를 넣고 30분간 반응시킨 후 reaction stopper를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 혈청 ml당 ng으로 나타내었다.

6) Total cholesterol 함량 측정

혈청의 total cholesterol 함량은 효소법<sup>22)</sup>에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고 total cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 dl당 mg으로 나타내었다.

7) HDL cholesterol 함량 측정

혈청의 HDL cholesterol 함량은 효소법<sup>22)</sup>에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 분리 시액 0.02 ml를 넣고 잘 섞어준 후 실온에서 10분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, HDL cholesterol 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 dl당 mg으로 나타내었다.

8) Triglyceride 함량 측정

혈청의 triglyceride 함량은 효소법<sup>23)</sup>에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 10분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, triglyceride 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 dl당 mg으로 나타내었다.

9) Free fatty acid 함량 측정

혈청의 free fatty acid 함량은 효소법<sup>24)</sup>에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 검체 0.02 ml에 효소 시액 I 1 ml를 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하고 효소 시액 II 0.5 ml를 넣고 잘 섞어준 후 다시 37°C에서 5분간 방치하여 파장 546 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하고, free fatty acid 량은 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 검체 l당 μEq으로 나타내었다.

10) Aldose reductase 활성 측정

Aldose reductase 활성은 Yamaoka 등의 방법<sup>25)</sup>을 약간 변경하여 일정량의 0.1 M 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 활성도는 1분당 1 mg의 단백질

이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

11) Sorbitol dehydrogenase 활성 측정

Sorbitol dehydrogenase 활성은 Hollmann 등의 방법<sup>26)</sup>에 준하여 일정량의 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.6) 용액에 기질인 10<sup>5</sup> 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 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 산화시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.

12) ROS 측정

DCFDA assay<sup>27)</sup>로 ROS를 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20°C에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 μM DCFDA와 600 U/ml esterase를 혼합하여 (최종 농도 6 U/esterase) 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 37°C에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 96 well microplate에 조직 균질액과 DCFDA를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다.

13) 과산화지질 함량 측정

신장 조직의 지질 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals (HAE) 함량을 kit를 사용하여 측정하여 평가하였다. 검체 0.2 ml에 N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile 0.65 ml, methanesulfonic acid 0.15 ml를 넣고 잘 섞어준 후 45°C에서 60분간 방치하고 15,000 × g에서 10분간 원심분리하여 그 상층액의 흡광도를 파장 586 nm에서 측정하였으며, MDA+HAE 량은 표준 검량 곡선에서 산출하여 μM으로 나타내었다<sup>28)</sup>.

14) Glutathione 함량 측정

조직 내 glutathione 함량 측정은 Ellman 등의 방법<sup>29)</sup>에 따라 측정하였다. 조직 균질액을 1,000 × g에서 원심분리한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 1 mM DTNB 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 GSH 함량은 protein 1 mg 당 nmole로 나타내었다.

15) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법<sup>30)</sup>과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

16) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

## 성 적

### 1. 혈중 glucose 및 insulin에 미치는 영향

혈중 glucose 함량은 정상 대조군에 비하여 ob/ob mouse인 당뇨 대조군에서 급격하게 증가되었으나 清血散추출물을 7.5, 15, 30 mg/kg 투여한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다. 혈중 insulin 농도는 당뇨 대조군에서 15배 이상 높게 나타났으나 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Table 2).

Table 2. Effects of the *Chunghyul-san*(CHS) extracts on serum glucose and insulin levels in mouse

	C57	ob/ob	ob/ob +CHS 7.5	ob/ob +CHS 15	ob/ob +CHS 30
Glucose (mg/dl)	143.59±11.91	403.79±31.54 <sup>a</sup> **	375.48±27.61	352.21±23.75 <sup>b</sup> *	283.67±21.03 <sup>b</sup> **
Insulin (ng/ml)	0.92±0.13	15.68±1.28 <sup>a</sup> **	14.78±1.34	12.01±0.98 <sup>b</sup> *	9.53±0.91 <sup>b</sup> **

Mice were administrated CHS (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05)

2. 혈청 지질 함량에 미치는 영향

혈청 total cholesterol 함량은 정상 대조군에 비하여 당뇨 대조군에서 유의하게 증가되었으나 실험군에서는 농도 의존적으로 저하되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다. Triglyceride 함량은 당뇨 대조군에서 유의하게 증가되었으나 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었으며, free fatty acid 함량은 유의성은 없었으나 감소되는 경향을 보였다. 혈청 HDL cholesterol 함량은 당뇨 대조군에서 유의하게 감소되었으나 실험군에서는 농도 의존적으로 증가되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Table 3).

Table 3. Effects of the *Chunghyul-san*(CHS) extracts on serum total cholesterol, triglyceride, free fatty acid and HDL cholesterol levels in mouse

	C57	ob/ob	ob/ob +CHS 7.5	ob/ob +CHS 15	ob/ob +CHS 30
Total cholesterol (mg/dl)	150.84±12.46	221.22±20.74 <sup>a</sup> **	211.48±16.59	200.01±17.54 <sup>b</sup> *	182.37±13.87 <sup>b</sup> *
Triglyceride (mg/dl)	64.59±4.15	122.46±13.68 <sup>a</sup> **	120.67±11.93	116.03±10.28	111.58±8.77 <sup>b</sup> *
Free fatty acid (μEq/l)	96.14±78.21	1605.57±98.19 <sup>a</sup> **	1591.27±91.23	1550.17±83.21	1492.33±79.82
HDL cholesterol (mg/dl)	28.64±2.08	22.58±1.85 <sup>a</sup> **	20.69±1.71	23.43±1.62 <sup>b</sup> *	24.85±1.64 <sup>b</sup> **

Mice were administrated CHS (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05)

3. Aldose reductase 활성에 미치는 영향

정상 대조군의 aldose reductase 활성은 3.11±0.27 nmoles/min/mg protein이었으나 당뇨 대조군에서는 5.09±0.44 nmoles/min/mg protein으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 4.98±0.41, 4.85±0.44, 4.42±0.38 nmoles/min/mg protein으로 당뇨 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 1).

4. Sorbitol dehydrogenase 활성에 미치는 영향

정상 대조군의 sorbitol dehydrogenase 활성은 32.28±3.08

nmoles/min/mg protein이었으나 당뇨 대조군에서는 61.97±5.51 nmoles/min/mg protein으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 59.74±5.44, 57.24±5.03, 51.76±4.18 nmoles/min/mg protein으로 당뇨 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 2).

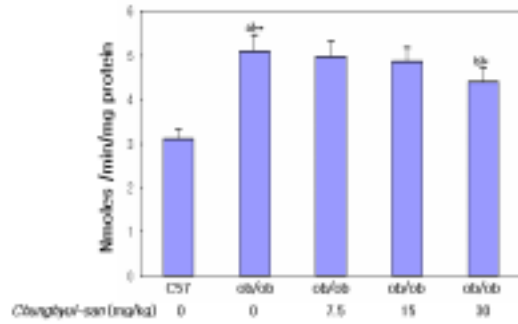


Fig. 1. Effect of *Chunghyul-san* on aldose reductase level in mouse kidney. Mice were administrated *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (\* : p < 0.05)

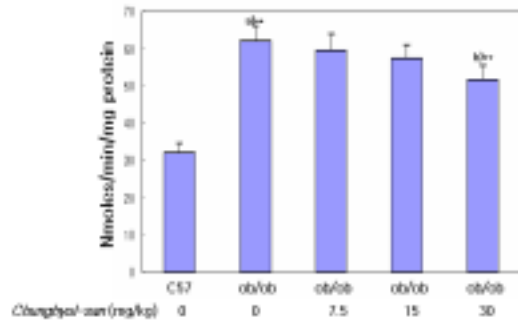


Fig. 2. Effect of *Chunghyul-san* on sorbitol dehydrogenase level in mouse kidney. Mice were administrated *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. (\*\* : p < 0.01)

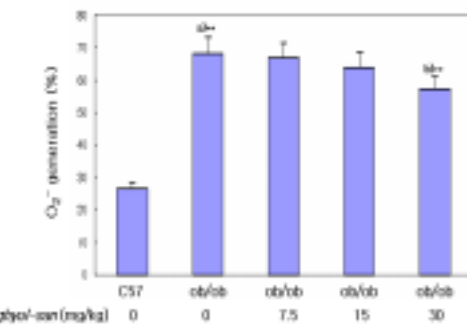


Fig. 3. Effect of *Chunghyul-san* on reactive oxygen species generation in mouse kidney. Mice were administrated *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. The Generation of reactive oxygen species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control(\*\* p < 0.01).

5. ROS 생성에 미치는 영향

정상 대조군의 ROS 생성은 26.45±2.08%였으나 당뇨 대조군에서는 68.29±5.49%로 급격하게 증가되었으며, 실험군에서는 66.88±6.07, 64.03±5.73, 57.09±4.39 %로 당뇨 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 3).

6. MDA+HAE 함량에 미치는 영향

정상 대조군의 MDA+HAE 함량은 11.29±0.89 μmoles/mg protein이었으나 당뇨 대조군에서는 27.83±2.38 μmoles/mg protein으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 27.06±2.44, 26.03±2.27, 22.87±1.93 μmoles/mg protein으로 당뇨 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 4).

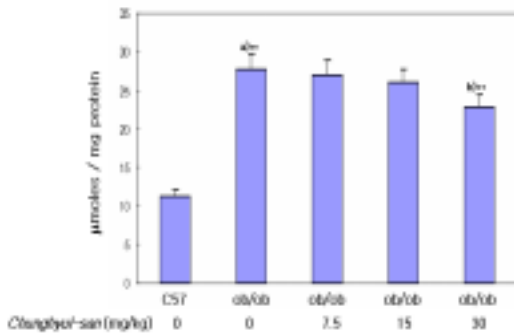


Fig. 4. Effects of Chunghyul-san on MDA+HAE level in mouse kidney. Mice were administrated Chunghyul-san(7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01).

7. Glutathione 함량에 미치는 영향

정상 대조군의 glutathione 함량은 19.86±1.59 nmole/mg이었으나 당뇨 대조군에서는 12.49±1.08 nmole/mg으로 유의하게 증가되었으며, 실험군에서는 13.53±1.19, 16.34±1.43, 21.09±1.81 nmole/mg으로 당뇨 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 5).

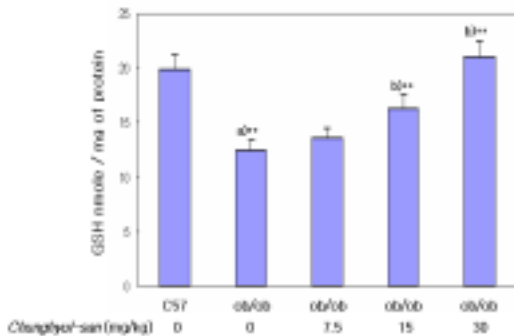


Fig. 5. Effect of Chunghyul-san on glutathione level in mouse kidney. Mice were administrated Chunghyul-san (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01).

고찰

2형 당뇨병은 40세 이후, 특히 비만인 사람에서 발병하기 쉬운 질환으로 인슐린 저항성을 특징적으로 나타낸다. 인슐린 저항성을 나타내는 사람들은 인슐린을 과다하게 분비함으로써 고혈당을 정상 혈당으로 조절하기 때문에 고인슐린혈증을 일으킨다. 인슐린 저항성에 대한 초기의 생리학적 적응은 β cell의 과다한 증식에 의한 고인슐린혈증이지만, 인슐린에 말초 조직의 저항성을 극복할만큼 충분한 인슐린을 분비하지 못하게 됨으로써 고혈당과 고인슐린혈증의 악순환을 반복하게 되어 결국 β cell의 괴사, 인슐린 결핍증, 심한 고혈당, 체중 감소 등을 초래하게 된다<sup>6-8)</sup>.

인슐린 저항성은 유전적인 요인과 함께 말초조직에서 인슐린 감수성을 감소시키는 식이 형태나 비만, 운동 부족, 스트레스 등의 생활과도 밀접한 관련이 있는 병리 상태로서 근래 들어 식이 형태와 생활 양식의 변화로 인해 비만 인구와 함께 제 2형 당뇨병이 증가 추세에 있다<sup>2,6-8)</sup>.

ob/ob 마우스는 유전적 고혈당 비만 마우스로서 Jackson Lab.에서 발견된 돌연변이체로 제6염색체상에 열성 유전자 ob가 homo 접합체(ob/ob)로 되었을 때 나타난다. 비만은 3주령에서부터 나타나기 시작하고 그 때부터 체중이 눈에 띄게 증가하여 80 g가지도 도달하여 정상 마우스(30-40 g)의 3배 가까이 된다. 체지방의 증가와 함께 인슐린 저항성이 나타나며 계속해서 고혈당과 고인슐린혈증을 보여 2형 당뇨병과 유사한 임상적 특성을 나타낸다<sup>31,32)</sup>.

淸血散은 저자들이 임상 경험을 통해 당뇨병과 고지혈증 및 비만의 치료에 효과적인 약물들을 선정하여 개발중인 처방이다. 榆根皮는 느릅나무의 코르크층을 벗긴 樹皮 및 根皮를 건조한 것으로 利水, 通淋, 消腫, 除邪氣. 久服輕身不飢 등의 효능으로 小便不通, 淋濁, 水腫, 癰疽發背, 丹毒, 疥癬 등의 치료에 사용되어 왔다<sup>33,34)</sup>. 실험 연구에 의하면 암세포 성장 억제 효과<sup>35)</sup>, 항산화 효과<sup>36)</sup>, 소염 및 면역 증진 효과<sup>37)</sup> 등이 있는 것으로 보고되었다. 龍膽草는 瀉肝膽火邪, 除下焦濕熱 등의 효능이 있어 肝經熱盛, 目赤, 咽痛, 熱痢, 陰部濕痒 등을 비롯한 염증성 질환의 치료에 사용되어 왔다<sup>38)</sup>. 山藥은 健脾止瀉, 補肺, 固腎, 養陰益精, 止渴 등의 효능으로 虛損勞傷, 健忘, 遺精, 消渴 등의 치료에 사용되어 왔으며<sup>34,38)</sup> 혈당 강하에 유효하다는 실험 보고가 있다<sup>39)</sup>. 滑石은 滲濕利尿, 瀉熱利水 등의 효능으로 中暑積熱, 嘔吐煩渴, 水瀉熱痢, 石淋 등의 치료에 활용되어 왔다<sup>38)</sup>. 그러므로 淸血散은 淸熱 祛濕 利尿 止渴 滋陰 등의 효능으로 당뇨병과 그 합병증의 예방과 치료에 효과를 나타낼 것으로 기대하고 본 실험을 시도하였다.

혈중 glucose 함량은 당뇨 대조군(ob/ob군)에서 정상 대조군(lean군)에 비하여 현저하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 15, 30 mg/kg 농도에서 유의하게 저하되는 것으로 나타났다. 이는 ob/ob 마우스에 順氣散을 투여한 실험<sup>17)</sup>에서 1 주부터 낮은 혈당을 유지하면서 용량 의존적인 혈당 강하 효과를 보인 것과 유사한 결과이다. 또한 혈중 insulin 함량도 ob/ob 대조군에서 현저하게 증가되었으나 淸血散추출물의 투여로 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 당뇨 대조군에서는 기존에 보고

된 ob/ob 마우스의 특징과 일치하게 혈당의 증가와 함께 고인슐린혈증을 나타낸 것이며, 淸血散추출물의 투여는 인슐린 수치를 농도 의존적으로 감소시킴으로써 인슐린 저항성과 고인슐린혈증을 개선시켜 혈당을 조절하는 것으로 생각된다.

지질 대사 장애는 2형 당뇨병과 긴밀한 연관을 가지고 있는데, 특히 높은 중성지방과 유리지방산은 골격근이나 지방 조직에서 인슐린 저항성과 밀접한 관련이 있다. 혈청 triglyceride는 각종 지방 조직의 주성분으로 생체의 에너지 저장에 관여하며 비만에서 증가되므로 지질 대사 이상의 해명에 중요한 지침이 된다. 혈청 free fatty acid는 총지방산의 4.5%에 지나지 않으나 주로 albumin과 결합하여 존재하며 말초 조직의 중요한 에너지원이 된다. 또한 비만, 당뇨병, 간질환에서 수치가 높기 때문에 비만의 정도가 심할수록 free fatty acid 함량이 증가하게 된다. HDL cholesterol은 말초 조직으로부터 cholesterol을 간으로 운반하여 제거하는 작용을 하여, 혈중 농도가 증가되면 동맥경화증을 예방할 수 있으나 감소되면 동맥경화증의 위험 신호가 된다. 본 실험 결과 당뇨 대조군에서 총콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산 수치가 유의하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 저하되는 것으로 나타났다. HDL cholesterol은 당뇨 대조군에서 유의하게 감소되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다.

고혈당 상태가 지속되면 비정상적인 당대사 과정인 polyol pathway가 가동되어 oxidative stress 현상을 한층 가속화시킨다. Polyol pathway는 정상 상태에서는 활성화되어 있지 않으나 고혈당 상태에서 세포내로 유입된 많은 양의 포도당이 aldose reductase에 의해 sorbitol을 형성하고, 이후 sorbitol dehydrogenase에 의해 과당으로 전환되는 과정으로서 신경조직, 망막, 신장, 수정체 등에서 이루어진다. 세포 내에 과당이 축적되어 수분을 삼투압에 의해 끌어들이게 되는데, 이 과정에 의해 당뇨병의 합병증인 망막병증, 백내장, 신경합병증 등이 진행된다<sup>2,12,13</sup>. 본 실험 결과 당뇨 대조군에서 aldose reductase와 sorbitol dehydrogenase 활성이 현저하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 30 mg/kg 농도에서 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 이는 淸血散추출물이 두 효소의 활성을 억제하여 polyol pathway의 비정상적인 작동을 정상적으로 조절해 줌으로써 oxidative stress로 인한 조직 손상을 억제시켜 당뇨병 합병증의 발현을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

당뇨병과 같은 병리적 상태에서는 ROS의 생성이 증가될 뿐만 아니라 각종 방어 기전의 저하로 조직이 손상될 가능성이 높으므로 ROS의 생성은 만성 합병증 발생에 관여하는 주요 기전의 하나로 주목받고 있다. 본 실험 결과 당뇨 대조군에서 ROS 생성이 현저하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 30 mg/kg 농도에서 유의하게 감소되는 것으로 나타났다.

ROS에 의해 세포막의 불포화지방산의 지질과산화로 생성되는 부산물인 MDA와 HAE의 생성에 대한 영향을 검토한 결과 당뇨 대조군에서 MDA+HAE 함량이 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 30 mg/kg 농도에서 유의하게 감소되었다. 이는 淸血散추출물의 ROS 소거 효과에 의해 세포막의 불포화지방산의 지질과산화를 억제함으로써 MDA+HAE가 저해된 것으

로 생각된다.

Glutathione 함량에 미치는 영향을 검토한 결과 당뇨 대조군에서 유의하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 15, 30 mg/kg 농도에서 유의성 있게 증가되었다. 淸血散추출물은 glutathione을 증가시켜 ROS를 소거시키고 oxidative stress를 감소시킴으로써 당뇨병 합병증의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

본 실험의 결과를 종합해 보면 淸血散은 ob/ob mouse에서 고혈당과 고인슐린혈증 및 고지혈증을 개선시켜 당뇨병 및 그 합병증의 발생을 억제하는 것으로 사료된다.

## 결론

淸血散이 2형 당뇨병 및 그 합병증의 예방과 치료에 효과를 나타내는 지를 규명하기 위하여 유전적 고혈당 비만 마우스 (ob/ob mouse)에서 혈당 및 혈청지질에 미치는 영향을 관찰하고 polyol pathway에 관여하는 효소의 활성과 ROS 생성 등에 미치는 영향을 검토하였다.

ob/ob mouse에서 혈중 glucose 함량과 insulin 농도가 유의하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 유의성 있게 감소되었다. 혈청 중 total cholesterol, triglyceride 및 free fatty acid 함량은 ob/ob mouse에서 유의하게 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 유의하게 감소되었으며, HDL-cholesterol 함량은 ob/ob mouse에서 유의하게 감소되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다. ob/ob mouse에서 aldose reductase 및 sorbitol dehydrogenase 활성이 유의하게 증가되었으나 淸血散추출물 투여로 억제되었다. ROS 생성은 ob/ob mouse에서 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 유의성 있게 저하되었다. ob/ob mouse에서 MDA+HAE 함량이 증가되고 glutathione 함량이 감소되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 유의하게 개선되었다.

이러한 실험 결과는 淸血散이 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 조절하고 ROS 생성을 저하시키며 과산화지질을 소거시키고 glutathione 함량을 증가시켜 oxidative stress를 감소시킴으로써 당뇨병 및 그 합병증의 발생을 억제하는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Kahn, C.R. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 34: 145-160, 1985.
2. 김웅진 외. 당뇨병학. 서울, 고려의학, pp 15-43, 32-33, 149-169, 391-468, 475-487, 609-616, 1998.
3. 민현기. 임상내분비학. 서울, 고려의학, pp 394-414, 1999.
4. Carmine, M., Giuseppe, L., Bruno, T. Insulin resistance and cardiovascular risk ; New insight from molecular and cellular biology. *Trends cardiovasc Med.* 16: 183-188, 2006.
5. Clay, F.S. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 116: 1813-1822, 2006.

6. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes. Metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5: 177-269, 1997.
7. Reaven, G.M. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev.* 75: 473-486, 1995.
8. Polonsky, K.S. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus. A genetically programmed failure of the  $\beta$  cell to compensate for insulin resistance. *New Engl J Med.* 334: 777-783, 1998.
9. Cai, H., Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-844, 2000.
10. Matsubara, T., Ziff, M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 137: 3295-3298, 1986.
11. Hammers, H.D., Martin, S., Fedesrlin, K., Geisen, K. and Brownlee, M. Aminoguanidine treatment inhibit the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 11555-11558, 1991.
12. Pugliese, G., Tilton, G.T. and Williamson, J.R. Glucose-induced metabolic imbalance in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev.* 7: 35-59, 1991.
13. Stevens, M.J., Dananberg, J., Feldman, E.L., Lattimer, S.A., Kamijo, M., Thomas, T.P., Shindo, H., Sima, A.A. and Greene, D.A. 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.* 94: 853-859, 1994.
14. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, p 477, 1986.
15. 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, p 239, 243, 1992.
16. 강석봉. 消渴의 傳變證과 당뇨병의 만성합병증에 대한 비교 고찰. *대한한의학회지* 19(2):137-152, 1998.
17. 한기선. ob/ob mice에서 順氣散의 항당뇨 활성 및 기전 연구. *경희대학교 대학원 석사학위논문*, 2002.
18. 장경선, 정기상, 최찬현, 오영준. 竹瀝과 누에가루 배합약물이 db/db mouse의 혈당 강하에 미치는 영향. *동의생리병리학 회지* 17(3):759-764, 2003.
19. 김형준, 윤철호, 정지천. 珍糖元의 고혈당 조절 작용 및 기전에 관한 연구. *대한한방내과학회지* 25(2):277-287, 2004.
20. 이철웅, 정지천, 신현철. 고혈당 흰쥐에서 鱗鱉의 혈당 조절과 항산화작용에 관한 연구. *대한한의학회지* 27(1):91-103, 2006.
21. Thomson, R.H. Colorimetric glucose oxidase method for blood glucose. *Clin Chem Acta.* 13: 133-135, 1966.
22. Levinson, S.S. Use of an enzymatic method for cholesterol, designed for continuous flow instrumentation, with discrete bichromatic and centrifugation analysis. *Clin Chem.* 23: 2335-2337, 1977.
23. Flether, M.J. A colorimetric method for estimation serum triglyceride. *Clin Chem.* 22: 393, 1968.
24. 金井泉 외. 臨床検査法概要. 동경, 금원, p 467, 1983.
25. Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J. and 3Kokai, Y. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia.* 38: 255-261, 1995.
26. Hollmann, S. In Hoppe-Seyler Thiefelder : *Handbuch der physiol. und path.-chem.* Vol. VIa. Berlin-Heidelberg-New York: Analyse, Springer. p 704, 1964.
27. Cathcart, R., Schwiers, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 134: 111-116, 1983.
28. Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyde and Related Aldehydes. *Free Rad Biol Med.* 11: 81-128, 1991.
29. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl group arch. *Biochem Biophys.* 82: 70-77, 1959.
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275, 1951.
31. Mordes, J.P. and Rossini, A.A. Animal models of diabetes mellitus. *Am J Med.* 70(2):353-360, 1981.
32. Eleazar, S. Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes metabolism reviews.* 8(3):179-208, 1992.
33. 孫星衍 輯. 神農本草經. 北京, 科學技術文獻出版社, p 39, 1999.
34. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 上海, 上海科學技術出版社, pp 166-168, 2438-2439, 1979.
35. Han, K.J., Lee, K.S., Kong, K.H., Cho, S.H. Separation and purification of substance having matrix metalloproteinase-9 inhibition effect in *Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* Nakai. *Anal Schi technol.* 16: 179-184, 2003.
36. 정창주. 楡根皮추출물이 흰쥐의 항산화계 및 지질대사에 미치는 영향. *조선대학교 대학원 박사학위논문*, 2006.
37. 이환용. 楡根皮의 소염 및 면역 증진 효과. *경희대학교 대학원 박사학위 논문*, 2005.
38. 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 113-114, 271-272, 492-493, 1981.
39. 송효정. 六味地黃湯加山藥이 Alloxan 당뇨 백서의 혈당 및 혈청 변화에 미치는 영향. *경희의학*, 8(4):388-398, 1992.