

Streptozotocin 유도 당뇨 흰쥐에서 주요 장부 간 조직학적 변화 비교 연구

오태우^{1#}, 강석용¹, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

Histological analysis of five organs in streptozotocin-induced diabetic rats

Tae Woo Oh^{1#}, Seok Yong Kang¹, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-814, Republic of Korea,
2 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to compare of histological changes on four target organs which related with diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods : Diabetes was induced in male Sprague-Dawley rats by consecutive injection of streptozotocin (STZ) at different doses of 30, 40 and 50 mg/kg for 5 days. After 4 weeks, all rats were sacrificed, five different organs such as pancreas, liver, kidney, and lung were isolated and observed their histological changes by hematoxylin and eosin (H&E), Periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's trichrome staining. The changes of body weight, blood glucose, and food and water intake were also measured.

Results : The multiple administration of STZ was induced diabetes in rats with hyperglycemia, decrease of body weight, increase water and food intake, and histopathological changes of target organs, compared with those of normal rats in both dose-dependent and time-dependent manner. In histological analysis, pancreas was showed decrease of the islet numbers with beta-cell loss. Kidney showed morphological damage with glomerulus hypertrophy, and also lung was showed bronchial epithelial damage with inflammatory cells infiltration. In liver, the portal vein and hepatic artery could not observed, and showed inflammatory cell infiltration with liver fibrosis.

Conclusions : These results suggest that the increase of the capacity of STZ, each of the more chronic disease, it can be seen that the damage was deep. Thus, evaluate the resulting drug appropriate depending on the purpose of the model is expected to be selected.

Key words : Diabetes, Streptozotocin, multiple administration, pancreas, kidney, lung, liver, histopathological analysis

서론

당뇨병(diabetes)은 고혈당(hyperglycemia)으로 인하여 나타나는 대표적인 대사성 질환으로 췌장에서 인슐린 분비가 부족하거나, 세포에서 인슐린에 대한 저항성이 발생하여 생물학적 효과가 감소함으로써 발생하는 질환으로 크게 인슐린 의존성과 인슐린 비의존성 당뇨병으로 분류된다¹⁻³⁾.

한의학에서 당뇨병은 소갈(消渴)의 범주에서 설명하며⁴⁾,

〈消渴病〉이라 하여 병정도의 진행 단계에 따라 상소(上消), 중소(中消), 하소(下消)로 나누며, 각각 구갈희음(口渴喜飲), 다식이기(多食易飢), 소변빈이양다(小便頻而量多)를 주요 증상으로 한다^{5,6)}. 상소는 폐와 연관되어 생기는 병으로 격소(膈消)라고도 하며 물을 많이 마시고 음식을 적게 먹으며 오줌이 맑으면서 잘 나오고, 중소는 위(胃)와 연관된 병으로 갈증이 나고 음식을 많이 먹으며 소변이 탁하고 누렇다. 또한 하소는

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#제1저자 : 오태우, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 054-770-2658 · E-mail : taewoo2080@gmail.com

· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 08일 · 채택 : 2013년 11월 08일

신(腎)과 관련된 병으로 기름 같은 소변이 자주 나오며 마르게 된다.

소갈에 대한 현대 의학적 해석으로 당뇨병이 인슐린의 절대량이 부족하거나(1형 당뇨) 또는 인슐린 저항성 때문에 인슐린이 제대로 작용을 못하게 되면(2형 당뇨) 포도당이 세포 내부로 흡수될 수 없어서 세포는 기아상태가 되고 이로 인해 부족한 세포내 당을 보충하기 위해서 우리 몸에서 허기를 느끼게 된다(다식).

또한 혈액 내 당이 넘침에 따라 신장에서의 재흡수가 안 되어 소변으로 배출되게 되고, 삼투압의 원리에 따라 소변 양이 늘어나면서(다뇨) 몸이 탈수상태가 되므로 더 많은 수분을 필요로 하게 되면서 갈증을 느끼게 되는(다뇨) 증상과 같다고 할 수 있다⁷⁾. 그러나 소갈에 대한 한의학적 해석을 현대 약리적 검증으로 비교, 분석한 연구는 없는 실정이다.

한편, 당뇨병 동물모델은 다른 질환에서 보다 다양하게 개발되어 있으며, 특히 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)이나 알록산(alloxan) 등의 베타세포 특이 독성물질 투여에 의해 유발되는 당뇨병 모델은 사람의 인슐린 의존형 당뇨병에서 나타나는 병리특성을 잘 나타내기 때문에 당뇨병 실험모델로 널리 사용되고 있다⁹⁻¹²⁾.

본 연구에서는 한의학에서의 소갈의 증상을 현대 약리적 방법으로 해석해보고자 STZ를 저용량으로 반복 투여하여 인슐린 의존형 당뇨병 흰쥐모델을 제작하였으며, 4주 동안 췌장, 폐, 간, 신장 등의 당뇨병 관련 표적 장부에서의 조직학적 변화와 혈액학적 변화를 관찰함으로써 향후 소갈의 진행 단계에 따른 한약의 인체 내 역할을 해석해보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 7주령 수컷 흰쥐(SD rat, 200-220 g)를 (주)오리엔트바이오(경기도, 한국)로부터 분양 받아 1주일 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간동안 일 반 고형사료(삼양사료주식회사, 서울, 한국)와 물을 자유 섭취 시켰으며, 실내온도 22±2℃, 습도 55±5%, 명암 12시간 (Day light 06:00 ~ 18:00)을 주기로 실험종료 시까지 일정한 사육조건을 유지시켰다.

2. 방법

1) 당뇨 유발

당뇨 유발을 위해 STZ(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 0.01M citrate buffer(pH 4.5)로 적정한 다음 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg body weight(bw) 용량으로 5일 동안 연속적으로 1일 1회 복강 주사하였다. 이때 정상군은 동일한 양의 0.1M citrate buffer를 복강 주사하였으며, 당뇨병 유발은 마지막 STZ 복강 투여 후 3일째 12시간 동안 절식시킨 후 꼬리정맥으로부터 채혈한 혈액으로부터 혈당측정 검사지 (Accu-Check, Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 이용하여 혈당을 측정함으로써 확인하였고, 혈당수치가 250 mg/dl가 넘는 동물만 선발하여 실험에 사용하였다.

2) 체중, 음수량 및 섭식량 측정

체중은 STZ 투여를 시작한 날을 -5일째로 하여 4주 동안 1일 1회 측정하였으며, 실험기간 동안 2일간격으로 음수량과 섭식량을 측정하였다.

3) 혈당 측정

혈당의 측정은 매주 1회 12시간 이상 절식시킨 후 모든 동물의 꼬리정맥으로부터 혈액을 수집하여 혈당측정검사지 (Accu-Check)를 이용해 측정하였다.

4) 병리조직학적 관찰

당뇨 유발 4주 후 모든 실험동물을 희생시키고 심장을 통하여 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거한 후 췌장, 폐, 간, 신장 조직을 적출하였다. 각 조직을 4%의 paraformaldehyde에 24시간 담가 고정하고, 파라핀 포매 과정을 거친 후 조직 절편기(microtome)를 이용하여 3 μm 두께로 박절하여 조직슬라이드를 제작하였다. 각 조직의 H&E 염색을 위해 조직슬라이드를 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 2~3분간 염색하였다. 또한 각 조직슬라이드를 2% periodic acid 용액으로 10분간 산화시키고 schiff 용액으로 37℃에서 30분간 염색하였다. 염색 조직슬라이드는 광학현미경을 이용하여 조직학적 변화를 관찰하였다.

한편, 조직 내 섬유화 정도를 확인하기 위해 조직슬라이드를 Bouin 용액(SigmaCo., St Louis, USA)에 하루 동안 담가 놓은 후 조직표본의 노란색이 없어질 때까지 수세하였다. 이를 hematoxylin으로 10분간 염색한 후 Biebrich Scarlet-acid fuchsin 용액으로 10분간 염색하였으며 다시 phosphomlybdic/phosphotungstic acid 용액에 10분간 반응시켰다. 끝으로 aniline blue 용액으로 5분간 염색한 후 수세하여 1% acetic acid 용액으로 1-3분간 적용시키고 염색정도를 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean±SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA를 실시하여 p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

결 과

1. 체중 변화에 대한 효과

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 체중 변화를 측정한 결과, 정상군의 체중은 4주까지 정상적으로 증가하였으나 STZ에 의해 당뇨가 유발된 대조군에서는 정상군에 비해 모든 STZ 용량 투여군에서 시간에 의존적인 감소를 나타내었다 (Fig. 1). 또한 이러한 당뇨 흰쥐에서의 체중 감소는 STZ 투여 용량에 유의적인 감소를 나타내지는 않았으나 STZ 용량이 높은 군에서 낮은 군 보다 체중 감소가 더 증가하는 것으로 나타났다.

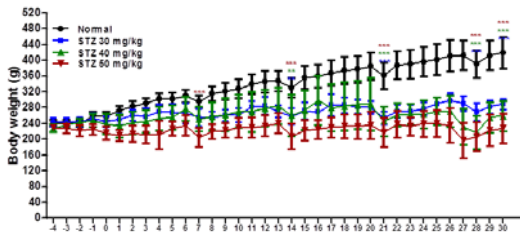


Fig. 1. The change of body weight in STZ-induced diabetic rats. STZ, was administrated with 30, 40, and 50 mg/kg in rats. Values are represented as mean±SD (n=6). *p<0.01 and **p<0.001 vs. Normal.

2. 혈당 변화에 대한 효과

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 혈당 변화를 측정한 결과, 정상군의 혈당은 4주까지 정상범위의 혈당 수치를 나타내었으나 당뇨가 유발된 군에서는 당뇨 유발 1주째부터 현저한 혈당 증가와 함께 4주까지 지속적으로 증가함으로써 고혈당 상태를 유지하였다(Fig. 2). 또한 STZ 투여용량 간 비교에서 40 mg/kg과 50 mg/kg 투여군이 30 mg/kg 투여군에 비해 혈당이 증가하였으며 4주에는 50 mg/kg 투여군이 가장 높은 혈당 수치를 나타내었다.

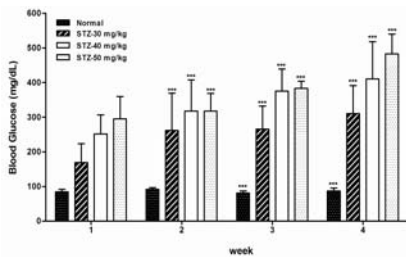


Fig. 2. The change of blood glucose level in STZ-induced diabetic rats. STZ, was administrated with 30, 40, and 50 mg/kg in rats. Values are represented as mean±SD (n=6). ***p<0.001 vs. Normal.

3. 섭식량의 변화

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 섭식량(food intake) 변화를 측정한 결과, 정상군의 경우 4주까지 일정한 양의 섭식량 변화를 나타내었으나 당뇨가 유발된 군은 2주째부터 섭식량이 현저히 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한 STZ 투여 용량에서는 30 mg/kg 투여군이 40 mg/kg과 50 mg/kg 투여군에서 보다 오히려 섭식량이 더 많이 증가하는 것으로 나타났으며, 고용량 투여군의 경우 3주째부터 섭식량이 줄어드는 것으로 나타났다.

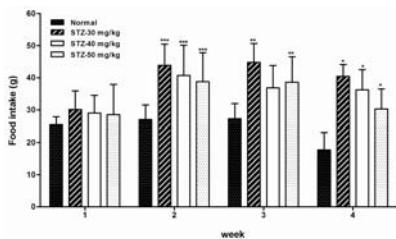


Fig. 3. The change of food intake in STZ-induced diabetic rats. STZ, was administrated with 30, 40, and 50 mg/kg in rats. Values are represented as mean±SD (n=6). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. Normal.

4. 음수량의 변화

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 음수량(water intake) 변화를 측정한 결과, 정상군의 경우 4주까지 일정한 양의 음수량 변화를 나타내었으나 당뇨가 유발된 군은 2주째부터 음수량의 현저히 증가가 관찰되었다(Fig. 4). 또한 STZ 투여 용량에서는 2주까지는 용량 의존적으로 음수량이 증가하였으나, 4주째는 50 mg/kg 투여군에서 음수량의 감소가 관찰되었다.

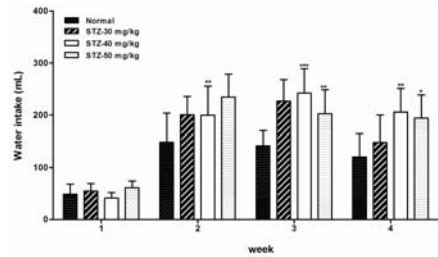


Fig. 4. The change of water intake in STZ-induced diabetic rats. STZ, was administrated with 30, 40, and 50 mg/kg in rats. Values are represented as mean±SD (n=6). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. Normal.

5. 병리조직학적 변화

1) H&E 염색에 따른 조직학적 변화

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 각 표적 장기별 병리조직학적 변화를 H&E 염색으로 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과, 정상군의 췌장조직은 많은 수의 선세포(acini cell)가 모여 하나의 공 모양을 이루는 랑게르한스섬(islet of Langerhans)의 형태가 뚜렷하게 잘 보존되어 있었으며 모세혈관의 분포가 풍부한 것을 확인하였다. 그러나 당뇨 유발 4주 후 췌장조직은 STZ 40 mg/kg과 50 mg/kg 투여군에서 심한 선세포 파괴 및 조직손상과 함께 랑게르한스섬이 거의 관찰되지 않았다(Fig 5A). 또한 신장조직에서는 정상군이 신장 사구체(renal glomerulus)의 고른 분포와 사구체 내 혈관극(vascular pole), 사구체 상피세포(podocytes), 주머니공간(capsular space), 요세관극(uninary pole), 원위요세관(distal tubules) 등이 잘 보존되어 있었으나, STZ 40 mg/kg과 50 mg/kg 투여군에서는 사구체 비후(hypertrophy)와 함께 염증세포의 침윤과 이형상피세포의 형성 등 형태적 손상이 관찰되었다. 특히 50 mg/kg 투여군에서는 현저한 사구체의 수적 감소가 관찰되었다(Fig. 5B). 한편, 폐 조직에서는 정상군의 경우 기관지, 세기관지, 폐포, 폐포관, 폐동맥 등의 형태가 잘 보존되어 있었으나 STZ 40 mg/kg 투여군에서는 기관지 내 상피세포층 손상과 염증세포 침윤이 관찰되었고, 50 mg/kg 투여군에서는 기관지 비후에 따른 협착과 염증세포 침윤과 형태적 손상이 관찰되었다(Fig 5C). 또한 조직 관찰에서도 정상군의 경우 비교적 크기가 크고 하나 또는 두 개의 소포형태를 띠는 핵을 가진 다각형(polygonal)의 간세포가 잘 관찰되었으나 STZ 투여군에서는 용량이 높아질수록 간세포 사이 균일한 형태의 간문맥이나 간 동맥 등의 관찰이 어렵고 구조적 손상이 많아진 것을 관찰하였다(Fig 5D).

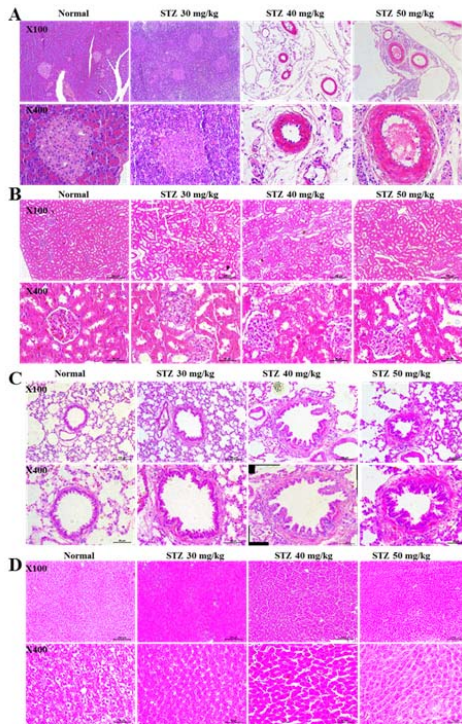


Fig. 5. The morphological changes of pancreas, kidney, lung and liver tissues in STZ-induced diabetic rats. Each tissue was stained with H&E, and observed in light microscope. Original magnification; upper, X100 and lower, X400.

2) PAS 염색에 따른 조직학적 변화

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 폐와 신장에서 배상세포 증식과 혈관 비후 및 침습에 대한 변화를 PAS 염색으로 확인하였다. 먼저 신장조직에서 정상군은 사구체낭과 신소체들이 잘 관찰되었으며 메산지움(mesangium) 세포의 증식이나 세포성 반월상이 관찰이 되지 않았다. 그러나 STZ를 투여한 군에서는 용량에 의존적으로 메산지움 세포의 증식과 사구체에서의 세포성 반월상과 다량의 염증세포 침윤이 심해지는 것을 관찰하였다(Fig. 6A). 한편 폐 조직에서는 STZ 40 mg/kg과 50 mg/kg을 투여군에서 기관지 주변으로의 염증세포 침윤과 상피하부의 섬유화 및 술잔세포(goblet cell) 증식으로 인한 점액분비 증가 현상이 관찰되었으며, 특히 STZ 50 mg/kg 투여군에서 술잔세포의 과형성으로 인한 점액분비 항진으로 매우 심하게 나타나는 것으로 관찰되었다(Fig. 6B).

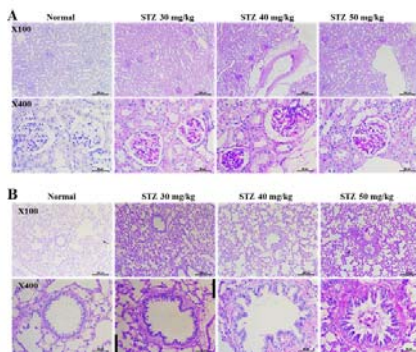


Fig. 6. The morphological changes of kidney and lung tissues in STZ-induced diabetic rats. Each tissue was stained with Periodic acid Schiff, and observed in light microscope. Original magnification; upper, X100 and lower, X400.

3) Trichrome 염색에 따른 조직학적 변화

STZ 용량에 따른 당뇨 흰쥐에서의 폐, 간, 신장 조직에서의 콜라겐 침착, 혈전 존재 및 면역복합체 침착 등 섬유화 정도를 비교하기 위해 trichrome 염색을 실시하였다. 그 결과, 정상군의 신장, 폐, 간 조직에서는 콜라겐 침착에 따른 섬유화가 관찰되지 않았으나, STZ를 투여한 군에서는 투여 용량에 의존적으로 각 조직에서의 섬유화가 심해지는 것으로 나타났다. 특히 신장조직에서 STZ 용량의 증가는 모세혈관벽을 따라 내피세포의 하면에 과립상 물질의 침적을 증가시켰으며 사구체의 형태적 변형이 심하게 일어나는 것으로 나타났다(Fig 7A). 또한 폐 조직에서도 STZ 투여 용량이 증가할수록 콜라겐 침착에 따른 섬유화 정도가 심화되었으며 섬유결합조직 상피세포의 과형성과 파리벽의 비후 및 파리 내강의 협소가 관찰되었다(Fig. 7B). 한편 간 조직에서는 균일한 형태의 간동맥 및 간동맥 관찰이 어렵고 조직 밀도가 떨어지며 주변 조직의 섬유화가 진행되는 것을 관찰하였다(Fig 7C).

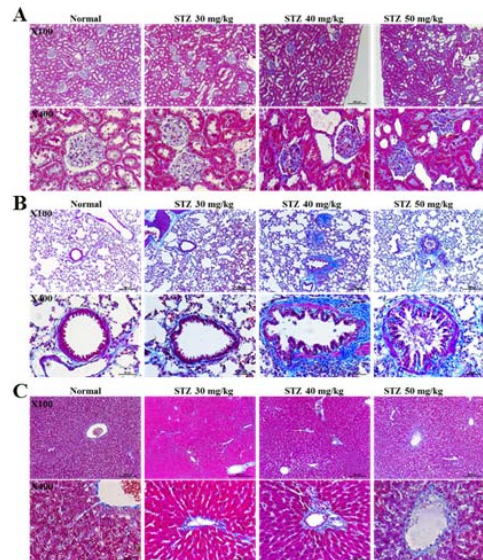


Fig. 6. The morphological changes of kidney, lung and liver tissues in STZ-induced diabetic rats. Each tissue was stained with Masson's trichrome and observed in light microscope. Original magnification; upper, X100 and lower, X400.

고찰

최근 당뇨병은 식생활의 변화와 노령인구의 증가로 급증하는 추세이며, 우리나라도 2000년대에 들어서는 30세 이상 남성의 13.5%, 여성의 10.7%가 당뇨 환자이며 전체 인구의 7.79%가 당뇨병 환자로 보고되고 있다¹²⁾. 이와 더불어 당뇨 관련 연구도 활발히 이루어지고 있으며 한약의 현대 약리적 효능에 대한 보고도 많아지고 있다.

한의학에서 당뇨는 《소문(素問)·기궤해(氣厥樞, 기병해(奇病樞))¹³⁾에 소(消), 소중(消中), 풍소(風消), 격소(臈消), 식역(食亦), 폐소(肺消) 등의 용어로 언급되었으며 소곡선기(消穀善飢), 음일이(飲一二), 선식이(善食二), 구감(口甘) 등의 증상이 현대의학에서의 당뇨병과 유사한 것으로 보고 있으며, 과음, 고량후미(高粱厚味)의 장기적인 섭취에 따른 음식부절로 습열내생(濕熱內生)하고, 억울하고 화나는 감정에 따른 정지실

조(情志失調)로 간화울결(肝火鬱結)해지면 점차 음허후손(陰虛虧損), 신수폐음모손(腎水肺陰耗損)되어 소갈(消渴)이 나타난다고 하였다³³⁾. 특히 소갈에서 오래되어 나타나는 소갈전변증(消渴轉變證)은 당뇨병에서 만성합병증의 증상들과 유사한 것으로 보인다. 한의학에서 소갈의 소(消)는 태운다는 뜻으로 몸의 진액과 정혈, 기육을 태우는 것이며 갈증이 생기므로 소갈(消渴)이라고 한다. 또한 일반적으로 상소(上消), 중소(中消), 하소(下消)로 구분하고 상소는 심화(心火)가 성하므로 심한 갈증이 주요 증상으로 나타나고(口渴, 多飮), 중소는 비허(脾虛)로 잘 먹지만(多食) 살이 빠지며, 소변이 잦고 위열이 많은 사람이 발생하기 쉬운 것으로 보고 있다. 또한 하소는 신허(腎虛)로 인해 발생하여 번조가 있고, 물을 찾으며, 소변 양이 많고(多尿), 기름 같고 다리와 무릎이 마르고 가늘어지는 증상을 나타낸다.

최근 한의학에서도 현대 약리기법들을 활용하여 다양한 당뇨동물모델로부터 한약의 효능과 기전을 밝히는 연구가 많이 이루어지고 있는데, 특히 인슐린 의존형 당뇨로써 스트렙토조토신(STZ)의 투여를 통한 당뇨동물을 많이 활용하고 있다¹⁴⁾. STZ는 당뇨 관련 약리시험을 위한 기본 동물모델로 사용되며 이러한 독성물질은 포도당과 유사한 분자구조를 포함하고 있어 췌장 내 인슐린분비세포인 베타세포를 선택적으로 파괴함으로써 당뇨를 유발하게 된다. 즉 STZ를 고용량(60~90 mg/kg)으로 투여하면 6시간 후부터 베타세포가 선택적으로 파괴(cell lysis)함으로써 췌장 내 내분비세포의 간격이 넓어지고 핵의 응축과 함께 세포죽음의 징후가 나타나고, 12시간 후부터는 세포죽음에 따른 소도세포의 감소 및 췌장소도의 퇴화가 일어나며, 24~48시간에는 거의 대부분의 베타세포와 일부 알파세포가 사멸하게 된다¹⁵⁾. 반면, 저용량의 STZ(30~50 mg/kg)를 5일간 연속적으로 투여하면 췌장소도에 림프구나 대식세포 등의 침윤과 베타세포의 사멸이 선택적으로 일어남으로써 고용량 투여와는 다르게 인슐린염(insulinitis)에 의한 전형적인 사람의 1형 당뇨병과 유사하게 유발되고, 베타세포의 파괴 후 알파세포의 동반 재생을 관찰할 수 있다. 따라서 STZ의 저용량 투여 모델의 경우는 베타세포 핵의 농축과 세포사멸체(apoptosis body)의 관찰이 뚜렷한 전형적인 세포사멸 형태를 나타내게 된다¹⁶⁾.

일반적으로 인슐린 의존형 당뇨 환자는 병이 만성적이거나 병증이 심하여 체중이 감소된다고 알려져 있으며, 이러한 증상은 STZ의 저용량 반복투여 동물모델에서 관찰할 수 있다. 즉 4주 이상 만성적으로 인슐린 의존형 당뇨가 진행될 경우 시간이 경과함에 따라 체중이 현저히 감소한다고 알려져 있다¹⁷⁾. 이는 췌장 내 베타세포 파괴로 인한 인슐린 생성 장애를 일으켜 세포내 포도당 이용률이 감소되면서 간과 근육 및 지방조직 내에 있는 지방과 단백질이 부족한 에너지를 생산하는데 소진되어 체중이 쉽게 회복되지 않기 때문이다^{18,19)}. 본 연구에서 저용량 STZ를 반복 투여하였을 때 시간에 의존적으로 체중 감소와 함께 식이 섭취량의 증가 및 음수량 증가가 관찰되었으며 이는 당뇨병 유발에 따른 대사 불균형으로부터 기인하는 것으로 사료된다.

한편, 췌장의 정상적인 조직학적 형태의 경우 알파세포와 베타세포의 조밀도가 높고 그 경계면이 뚜렷하여 인슐린의 분비가 정상적으로 분비됨을 확인 할 수가 있으나 STZ 유도 당뇨 동물에서는 베타세포로부터 xanthine oxidase 활성이 증

가됨으로써 산화물 생성과 유전자 분절 등을 통해 세포사멸과 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다^{20,21)}. 또한 신장조직에서는 당뇨로 인해 사구체 기저막과 메산지움의 비후가 두드러지고 이들을 구하는 laminin, fibronectin과 같은 정상 단백질의 양적 변화 및 비정상적인 콜라겐(collagen IV) 축적으로 사구체 손상이 일어나게 되고 tumor growth factor (TGF)가 세포의 기질에 콜라겐 축적을 유도함으로써 섬유화 시키게 된다고 알려져 있다^{22,23)}. 특히 STZ-유도 당뇨동물의 신장조직에서 TGF의 발현 증가²⁴⁾ 및 고혈당의 TGF 촉진자 활성화²⁵⁾가 관찰되고 TGF의 과발현은 세포외 기질인 laminin, fibronectin, collagen 등의 합성을 촉진시킴으로써 사구체 기저막 비후, 메산지움세포 비대, 세포외 기질 축적, 세포간질 섬유화, 사구체 경화증 등을 유발한다고 알려져 있다^{26,27)}. 본 연구에서 STZ의 저용량 반복투여는 흰쥐 췌장의 심한 조직학적 손상을 동반하였으며 특히 랑게르한스섬 관찰이 거의 불가능하였다. 신장 조직에서도 STZ의 반복투여는 사구체 비후와 다량의 염증세포 침윤 및 이형상피세포 형성 등의 형태적 손상을 유발하였고 용량에 의존적으로 사구체 수가 감소되었다.

자유기(free radicals)는 정상적인 대사과정 중에서도 생성되지만 당뇨조건에서 자유기 생성체가 더욱 축적됨으로써 지질 과산화를 통해 조직의 산화적 손상을 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 또한 당뇨 상태에서는 산화적 스트레스에 대한 감수성이 더욱 증가하며 자유기 생성이 촉진되고²⁸⁾, superoxide radicals이나 hydroxy radicals과 같은 산소 자유기 생성에 의해 조직의 구조적, 기능적 손상 뿐 아니라, DNA 손상을 일으키게 된다^{29,30)}. 특히 산화적 스트레스에 손상 받기 쉬운 간이나 폐 조직은 일련의 염증반응과 인슐린저항성, 고인슐린혈증 등으로 유리지방산의 이동이 증가하고 간세포 내 지방 축적이 초래됨으로써 간세포의 이차 손상으로 산화적 손상을 더욱 쉽게 받을 수 있는 환경을 만들어 간소염에 염증을 일으키게 된다³¹⁾. 본 연구의 간 조직 변화에서 STZ의 반복투여는 간문맥과 간동맥의 손상과 조직밀도 감소, 염증세포 침윤 및 콜라겐 침적에 따른 조직 섬유화 진행이 관찰되어 기존 보고와 일치하는 것을 알 수 있었다³²⁾. 한편, 폐 조직에서는 STZ 투여 용량에 따라 기관지 상피세포층 손상과 무신 축적, 염증세포 침윤이 관찰되었으며, 특히 고용량 투여군에서 간 조직에서와 마찬가지로 콜라겐 축적에 의한 조직섬유화가 심화되는 것을 관찰하였으며, 기관지 비후에 따른 혈관 협착 등 형태적 변형이 심하게 나타났다.

결론적으로 흰쥐에 STZ의 저용량 반복투여는 췌장 베타세포사멸의 특징적인 형태를 나타내었으며 STZ의 투여용량은 당뇨병 정도에 영향을 줌으로써 체중 감소, 음수량 및 섭취량 증가를 동반하였고, 표적장기인 췌장, 간, 신장, 폐 조직의 조직학적 손상정도에 영향을 주는 것으로 나타났다. 따라서 STZ 30 mg/kg 반복투여모델을 향후 소갈 한약의 소갈 단계에 따른 당뇨 표적장기에서의 역할 분석을 위한 당뇨 동물모델로 활용하고자 한다.

결론

본 연구에서는 STZ 투여에 의한 당뇨흰쥐 모델에서 STZ

투여 용량조절에 따른 주요 표적 장기에서의 조직학적 변화를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. STZ 30, 40, 50 mg/kg를 반복 투여하였을 때 4주 후 체중은 용량에 의존적으로 감소하였다.
2. STZ 30, 40, 50 mg/kg를 반복 투여하였을 때 4주 후 혈당은 용량에 의존적으로 증가하였다.
3. STZ 30, 40, 50 mg/kg를 반복 투여하였을 때 1주부터 섭식량과 음수량은 용량에 의존적으로 증가하였으며, 30 mg/kg 투여군은 시간에 의존적으로 증가하였으나, 40, 50 mg/kg 투여군에서는 3주부터 감소하였다.
4. STZ 30, 40, 50 mg/kg를 반복 투여하였을 때 1주부터 음수량은 용량에 의존적으로 증가하였으며, 30 mg/kg 투여군은 시간에 의존적으로 섭식량이 증가하였으나, 40, 50 mg/kg 투여군에서는 3주부터 섭식량이 감소하였다.
5. STZ 30, 40, 50 mg/kg를 반복 투여하였을 때 투여 용량에 의존적으로 췌장, 신장, 폐, 간 조직의 조직학적 손상이 관찰되었다.

이상의 결과로부터 STZ 저용량 반복투여는 용량에 의존적으로 당뇨병을 심화시켰으며, STZ 30 mg/kg 반복투여모델이 소갈 단계에 따른 한약의 표적장기에서의 역할 분석을 위한 당뇨 동물모델로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년 한국한의학연구원 한의이론과학화사업의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다 (K-2013-A0175-00003).

References

1. Yoon JW, Kim CJ, Pak CY, McArthur RG. Effects of environmental factors on the development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Invest Med*. 1987 ; 10(5) : 457-69.
2. Nepom GT. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes*. 1990 ; 39(10) : 1153-7.
3. Im JI. Recent trends in diabetes research. *Health Industry Technology Trends*. 2003 ; 1 : 28-38.
4. Hong WS. Hwang-Je-Nae-Gyeong-So-Moon. Seoul : Publisher of Oriental medicine, 1981 : 18, 138, 145, 163, 179, 180, 238, 249, 257, 263, 269, 274, 297, 299, 301, 304.
5. Song JC, Kim SU, Chae SA, Eom DM. A review on thirst disease prescription in Sikryochanyo. *J Oriental Medical Classics*. 2012 ; 25(3) : 39-49.
6. Gong SE, Yoon IJ, Heo DS, Oh MS. Study of oriental medical science documentary records of "So-gal". *J Daejeon Univ Inst Orient Med*. 2007 ; 16(1) : 107-14.
7. Cho SY, Yoo WJ, Ahn SW, Kim NI. The formation of Sogal concept and classification in Korean Traditional Medicine. *Korean J Orient Med*. 2007 ; 13(2) : 1-14.
8. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981 ; 294(5838) : 284-6.
9. Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem*. 1982 ; 257(11) : 6084-8.
10. Castillo GM, Nishimoto-Ashfield A, Banerjee AA, Landolfi JA, Lyubimov AV, Bolotin EM. Omeprazole and PGC-Formulated Heparin Binding Epidermal Growth Factor Normalizes Fasting Blood Glucose and Suppresses Insulinitis in Multiple Low Dose Streptozotocin Diabetes Model. *Pharm Res*. 2013 ; 30(11) : 2843-54.
11. Herold KC, Bloch TN, Vezys V, Sun Q. Diabetes induced with low doses of streptozotocin is mediated by V beta 8.2+ T-cells. *Diabetes*. 1995 ; 44(3) : 354-9.
12. Korean Diabetes Association. *Diabetes Mellitus*. Seoul : Korea-Medicine publishing company. 2005 : 193-4.
13. Wang B(王). Hwangjaenaegyungso-mun(黃帝內經素問). Seoul : Daesung Munhwa publishing company. 1994 : 236-7, 284-8.
14. Jung HS, Yu JS, Song BY. Recent Research Trends in Korean Medicine Treatment of Diabetes mellitus. *J Pharmacopuncture*. 2008 ; 11(4) : 65-77.
15. Park IS, Che YZ, Bendayan M, Kang SW, Min BH. Up-regulation of clusterin (sulfated glycoprotein-2) in pancreatic islet cells upon streptozotocin injection to rats. *J Endocrinol*. 1999 ; 162 : 57-65.
16. Kim BM, Han YM, Shin YJ, Min BH, Park IS. Clusterin expression during regeneration of pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2001 ; 44 : 2192-202.
17. Lozoya X, Reyes-Morales H, Chávez-Soto MA, Martínez-García Mdel C, Soto-González Y, Doubova SV. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J Ethnopharmacol*. 2002 ; 83(1-2) : 19-24.

18. Pain VM, Garlick PJ. Effect of Streptozotocin Diabetes and Insulin Treatment on the Rate of Protein Synthesis in Tissues of the Rat in Vivo. *J Biol Chem*. 1974 ; 249(14) : 4510-4.
19. Rossini AA, Like AA, Dulin WE, Cahill GF Jr. Pancreatic beta cell toxicity by streptozotocin anomers. *Diabetes*. 1977 ; 26(12) : 1120-4.
20. Nukatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Enhancement by streptozotocin of O₂⁻ radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*. 1988 ; 239(2) : 295-8.
21. Kröncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995 ; 376(3) : 179-85.
22. Han YK, Park YK. Effect of *Atractylodis Rhizoma Alba* water extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Kor J Herbology*. 2011 ; 26(4) : 23-30.
23. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2001 ; 44(11) : 1957-72.
24. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagooka I, Tomino Y, Koide H. mRNA expression of growth factor in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes*. 1993 ; 42 : 450-6.
25. Lee YJ, Lee YJ, Yoon JJ, Lee SM, Kim HY, Shin SH, Kang DG, Lee HS. Anti-diabetic and Anti-Inflammatory Effects of Water Extract of *Ligustrum japonicum* Leaves in db/db Mouse. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(6) : 107-14.
26. Sharma K, Ziyadeh FN. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 1997 ; 17 : 80-92.
27. Aoyama I, Shimokata K, Niwa T. Oral adsorbent AST-120 ameliorates interstitial fibrosis and transforming growth factor b1 expression in spontaneously diabetic (OLETF) rats. *Am J Nephrol*. 2000 ; 20 : 232-41.
28. Urano S, Hoshi-Hashizume M, Tochigi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *lipids*. 1991 ; 26(1) : 58-61.
29. Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol*. 1990 ; 25(6) : 499-522.
30. Behrens WA, Madere R. Vitamin C and vitamin E status in the spontaneously diabetic BB rat before the onset of diabetes. *Metabolism*. 1991 ; 40(1) : 72-6.
31. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hit"?. *Gastroenterology*. 1998 ; 114 : 842-5.
32. Kim HW, Ha TH, Cho MR, Cho SI. Effects of Herbal Remedy for Diabetes Mellitus-01 (HRDM-01) on Liver and Serum Lipid Level in Diabetic Rats. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(3) : 117-21.
33. HS Jang, JS Yu, BY Song. Recent research trends in Korean Medicine treatment of diabetes mellitus. *J Pharmacopuncture*. 2008 ; 11(4) : 65-77.