



Original Article / 원저

도인승기탕에 의한 당뇨병성 혈관장애 개선효과

이윤정^{1,2,3}·김언국²·김혜음^{1,2,3}·윤정주^{1,2,3}·이소민^{1,2,3}

이용표^{1,2,3}·이건목²·강대길^{1,2,3}·이호섭^{1,2,3*}

¹한외과대학 생리학교실, ²원광대학교 한의학전문대학원, ³한방체액조절연구센터

Therapeutic Effect of Doinseunggi-tang on Diabetic Vascular Dysfunction

Yun Jung Lee^{1,2,3} · Eon Kuk Kim² · Hye Yoom Kim^{1,2,3} · Jung Joo Yoon^{1,2,3}

So Min Lee^{1,2,3} · Geon Mok Lee² · Dae Gill Kang^{1,2,3} · Ho Sub Lee^{1,2,3*}

¹College of Oriental Medicine

²Professional Graduate School of Oriental Medicine

³Hanbang Body-fluid research center, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : Diabetes mellitus is the leading cause for vascular complications such as atherosclerosis. The present study is to investigate whether Doinseunggi-tang (DST) improves diabetic vascular dysfunction in type II diabetes.

Methods : The db/db mice were treated with high fat/high cholesterol diet and DST (200 mg/kg/day) for 8 weeks.

Results : DST significantly lowered blood glucose and systolic blood pressure. In addition, DST also markedly decreased total plasma cholesterol, triglyceride, and LDL-cholesterol, whereas increased the HDL-cholesterol. Vascular relaxation of aortic rings by acetylcholine or SNP was ameliorated by DST in a dose-dependent manner. Damage of vascular intima and hypertrophic of media was improved by DST. Immunohistological study revealed that DST attenuated the increase of ICAM-1, VCAM-1, and ET-1 expression in thoracic aorta.

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This is an open access journal which permits unrestricted access via the internet (URL, <http://www.ompak.okdanche.com>.) non-commercial use, distribution, reproduction and providing the original work is properly cited.

Conclusions : Taken together, DST suppressed hyperglycemia and diabetic vascular dysfunction in type II db/db mice. The present data suggests that Doinseunggi-tang may be prevent a development of diabetic atherosclerosis.

Keyword : Doinseunggi-tang, Hypertension, Diabetes, Vasorelaxation, Cholesterol.

I. 서 론

당뇨는 인슐린의 부족 또는 인슐린의 기능 저하로 인해 탄수화물, 단백질, 지질 대사가 비정상적으로 진행되어 고혈당과 이상지혈증 (dyslipidemia)을 나타내게 된다. 만성적인 고혈당 상태는 다양한 합병증으로 이행되는데, 주요 만성 합병증으로는 당뇨병성 망막, 당뇨병성 신부전, 동맥경화증과 함께 고혈압, 신장병, 뇌졸중 및 심장병을 악화시키기도 한다¹⁾. 특히, 죽상경화 같은 대혈관 관련 질환은 당뇨병 환자에게 중요한 합병증이며, 높은 사망률에 기인하는 질환이다^{2, 3)}. 혈관 내피 세포 손상은 세포 유착 분자 및 사이토카인의 과발현을 통하여 나타나며, 특히 죽상경화에 의한 손상에서 있어 혈관 내벽은 intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 등과 같은 세포유착 분자 (cell adhesion molecules) 발현 증가를 유도한다⁴⁾. 이러한 상황에서 수많은 백혈구가 혈관 내벽에 붙게 되며, 혈관 내벽을 통과하여 내피 세포 기능 저하 및 조직 손상을 유발하게 된다. 따라서 이러한 혈관 질환을 억제하고 치료하는 합성 의약품의 사용이 크게 증가되고 있으나 이들 대부분 심각한 부작용을 동반하기 때문에 보다 안전하고 효과 있는 천연물의 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다⁵⁾. 이에 우리는 이미 오래전부터 임상에서 사용되어 온 천연물들의 복합물인 도인승기탕을 이용하여 본 연구를 진행하였다.

도인승기탕 (桃仁承氣湯)은 감초, 대황, 도인, 그리고 육계의 복합물⁶⁾로서 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)는 단맛 성분인 glycyrrhizin을 함유하여 감미료로 사용되고 있으며, 약리작용으로는 해독작용, 면역 작용, 신장염, 전립선염 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{7, 8)}. 최근 연구에 의하면 도인승기탕이 알츠하이머 질환 모델의 신경 세포에 대한 보호 효과 및 백서의 간 손상에 대한 개선 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다^{9, 10)}. 도인승기탕을 구성하는 각각의 약제들 중 대황 (*Rhizoma Rhei Radix*)은 뿌리를 건조시킨 약제로, 항염증 작용 및 항산화 효능을 갖는다고 하였다¹¹⁾. 특히 도인승기탕을 구성하는 주요약제인 도인 (*Persicae Semen*)은 《神農本草經》¹²⁾에서 “味苦平 ... 主瘀血 血閉 瘦邪殺小蟲”이라 하였고, 《本草綱目》¹³⁾에서는 “主治瘀血血閉 癥瘕 瘦邪氣 殺小蟲”이라고 하였으며, 천연 항산화제, 노화억제, 항암억제제로 오래 전부터 여성의 질환과 퇴행성 질환 등에 사용되었으며 항암 및 항-어혈 작용 등이 보고되어 있다^{14, 15, 16)}. 육계 (*Cinnamomi cortex*)는 녹나무과 Lauraceae에 속하는 육계의 수피를 건조한 한약재¹⁷⁾로 주성분은 정유성분인 cinnamic acid 와 cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol acetate, phenylpropyl acetate, methyl vinyl ketone 등이 보고되어 있고, 약리 연구로는 혈관 확장작용, 혈액순환 촉진 작용, 진정, 해열, 건위작용 등이 보고되어 있다^{18, 19)}. 도인승기탕과 유사한 처방으로는 대황목단피탕²⁰⁾ (동과자, 대황, 도인, 망초, 목단피), 계지복령환²¹⁾ (도인, 계지, 복령, 목단피, 작약), 당귀승기탕²²⁾ (당귀, 대황, 망초, 감초), 그리고 칠물후박탕²³⁾

*교신저자 : 이호섭, 원광대학교 한의과대학 생리학교실

· Fax : 063-850-7260

· E-mail : host@wku.ac.kr

· 접수 2013/03/28 · 수정 2013/04/17 · 채택 2013/04/19



(후박, 지실, 대황, 감초, 계지) 등이 있으며, 이들 처방은 당뇨병성 질환들의 개선 또는 항산화 효과 등을 가지는 것으로 연구되었다. 그러나 도인승기탕의 구성 약재 각각은 많은 연구결과가 보고되어 있을 뿐 아니라 유사 처방에 대한 연구도 보고되었음에도 불구하고, 도인승기탕 자체에 대한 약리작용은 전반적으로 수행되어 있지 않다.

db/db 마우스 (C57BL/KsJ)는 시상하부에 위치한 비만 유전자 (leptin) 수용체인 Ob-Ra가 변이되어 leptin 신호전달과정에 결함이 생겨 과도한 먹이 섭취, 지방 축적이 일어나 제 II형 당뇨와 유사한 형태의 비만증, 고인슐린혈증, 고혈당 등을 나타내는 동물이다.²⁴⁾ 그러므로 본 연구는 db/db 마우스에 고지방/고콜레스테롤 식이를 실시하여 감초, 대황, 도인, 육계 등의 복합처방인 도인승기탕의 투여에 따른 대사기능 및 혈관 장애 개선 효과를 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

도인승기탕(135g)은 전탕 추출법을 이용하여 제조하였다. 감초(15g), 대황(75g), 도인(37.5g), 육계(7.5g)는 건조된 것을 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 증류수 1,000mL가 들어있는 냉각기가 설치된 삼각 플라스크에 넣은 후 120분간 가열하였다. 도인승기탕 추출액을 3,000rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 회전식 증발기로 감압 농축한 후 동결 건조하여 추출물 23.45g (수득율 17.37%)의 분말을 얻었다.

2. 실험동물 및 식이

실험은 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻어 시행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다. 7주령의 수컷 db/db마우스 (C57BL/KSJ, n=10)와 Wild type 마우스 (C57BL/KSJ-m⁺/m⁺, n=10)를 central Lab. (Seoul, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 8주령이 되었을 때 다음과 같이 10마리씩 4개 그룹으로 무작위로 구분하였다.

1군: 대조군 (Wild type 마우스, 일반식이), 2군:

당뇨유발군 (db/db마우스, 고지방식이), 3군: 양성대조군 (db/db마우스, 고지방식이, ro-siglitazone, 10 mg/kg/day), 4군: 도인승기탕 투여군 (db/db마우스, 고지방식이, 200mg/kg/day). 고지방식이군은 60kcal% fat/300.8 mg/kg cholesterol (D12492)를 8주간 섭취하였다. 양성대조군으로는 PPAR (proliferator-activated receptor)- γ 길항제로 잘 알려진 ro-siglitazone (RG)을 사용하였다. 실험기간 동안 식이와 식수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 체중은 매주 측정하였으며, 혈당, 소변량, 삼투압 및 전해질량은 2주에 한번 측정하였다. 사육실의 온도 및 습도는 각각 22±2°C 및 50~60%로 유지 하였으며, 12시간 간격으로 점등 및 소등 하였다.

3. 혈당의 측정

혈당은 마우스의 꼬리정맥의 전혈에서 Onetouch[®] Ultra[™] Blood glucose Meter 및 Test Strip (Life Scan Inc., CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 측정값은 Onetouch[®] Ultra[™] Blood glucose Meter의 수치를 mg/dL로 나타내었다.

4. 혈압의 측정

수축기 평균혈압은 automatic sphygmotonomograph (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)를 이용하여 흰쥐의 꼬리 동맥에서 측정하였다. 각 개체마다 최소 8번 혈압을 측정하고 그 중 5mmHg 내에 있는 5번의 측정값을 평균값으로 이용하였다.

5. 콜레스테롤 및 지질 함량 측정

혈장은 3,000rpm으로 20분 동안 원심분리하고, 분석장비로서 Hitachi 7080(Hitachi, Japan)을 사용하였다. 혈장지질수치와 생화학적 수치는 8주 동안 투여한 후 공복 시 혈장으로 마지막 주에 분석하였다. 마우스 혈장에 대하여 serum triglyceride(TG), total cholesterol(T-CHO), low-density lipoproteins(LDL), high-density lipoproteins(HDL)의 혈액생화학적 수치를 측정하였다.

6. Creatinine 및 creatinine 제거율 측정

혈장의 creatinine은 분광광도계 (Milton Roy, Rochester, NY, USA)를 이용해 정량하여 측정하였다.

7. 흉부대동맥의 분리 및 혈관장력 측정

실험동물을 단두한 후 흉부 대동맥을 분리하였다. 분리된 흉부 대동맥을 118mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1mM MgSO₄, KH₂PO₄, 1.5mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 10 mM glucose가 들어있는 차가운 Krebs 용액 (pH 7.4)에 넣고 연결 조직과 지방을 제거한 후 약 3 mm의 길이의 절편으로 만들었다. 흉부 대동맥 절편에 95% O₂-5% CO₂ 기체로 포화시킨 37°C의 Krebs 용액으로 고정시킨 후 force-displacement transducer (Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계 (Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 isometric tension을 측정하였다.

실험에 사용된 혈관은 내피세포가 손상되지 않도록 주의하여 분리하였으며, Krebs's 용액에서 1g 휴지기 장력을 유지하면서 1시간 동안 안정화시켰다. 혈관이 안정화된 후 phenylephrine으로 수축시켰고 이어서 SNP 및 ACh에 대한 혈관이완 반응을 측정하였다.

8. 조직절편 제작과 hematoxylin-eosin 염색

적출된 흉부대동맥 조직을 10% 포르말린 (pH 7.4)에 3일 고정시킨 후, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 50% 알코올에서부터 100% 알코올까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기 (microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 6 - 7 μ m으로 자른 뒤 슬라이드 위에 부착 시켜 실온에서 3일 동안 건조시킨다. 절편된 조직이 붙어있는 슬라이드를 xylene 용액에 넣고 파라핀을 제거한다. 100%, 80%, 70% 알코올 순으로 탈 xylene, 함수 과정을 거쳤으며 수돗물에 세척하였다. 핵 염색을 위해 Harris hematoxylin

solution (Sigma, USA)에 8분 동안 슬라이드를 침적시킨 후 수돗물에 세척한다. 감별탈색을 위해 1% HCl-Alcohol에 5초씩 2번 침적시켜 수돗물로 세척한다. 0.5% Ammonium Water로 중화 현색 한 뒤 수돗물에 세척하고, 세포질 염색을 1% eosin Y solution (Muto, Japan)에 2분 동안 침적시킨 후 60%, 80%, 90%, 100% 알코올 순으로 탈수과정을 거친다. xylene 용액에서 투명 과정을 거쳐 봉입제로 봉합 한 후 광학현미경으로 400배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다 (BX41, Olympus, Japan).

9. 혈관염증 발현 마커 및 혈관 수축인자의 발현 측정

적출된 흉부대동맥 조직을 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4°C에서 5시간 고정하고, 30% sucrose 용액에 조직을 침적시켰다. 조직을 OCT compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance)에 넣고 영하 20°C에서 동결한 후 cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA)를 이용하여 4 μ m의 두께로 평행하게 횡단 절편을 만든 후 poly-L-lysine 용액으로 코팅한 슬라이드글라스 위에 부착시켰다. 실온에서 하룻밤 충분히 건조시킨 다음 영하 70°C에서 보관하였다. HISTO-STAIN[®]-SP Kits (Invitrogen Inc, USA)를 사용하여 [strept]Avidine-biotin 방법을 이용하여 염색을 진행하였다. 절편이 붙어 있는 슬라이드를 실온에 1시간 정도 건조시킨 후 PBS로 3번 세척한 후 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 넣어 1분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 PBS로 3번 세척한 다음 10% non-immune goat serum을 사용하여 20분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. Blocking antibody를 제거한 뒤 CAMs (ICAM-1, VCAM-1) 및 ET-1에 각각에 결합하는 mouse monoclonal IgG 및 Goat polyclonal anti-mouse IgG (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology, USA)을 습윤상자에 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 슬라이드를 세척한 다음 이차항체인 biotinylated secondary antibody에 20분 동안 실온에서 반응

시킨 후 PBS로 5분씩 세 번 세척하였다. Horse-radish peroxidase-conjugated streptavidin에 30분 동안 반응시킨 후 PBS로 세 번 세척하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) chromogen과 hWMAtoxylin (zymed, CA, USA)을 이용하여 일정시간 동안 발색시킨 다음 슬라이드를 흐르는 물에 씻어 반응을 중지시킨 후 봉입제로 봉입하였다. 각각의 발현 정도는 광학현미경으로 1,000배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다 (BX41, Olympus, Japan).

10. 통계처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 Students t-test 나 one-way ANOVA test를 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

III. 결 과

1. 혈당 및 혈압 변화

도인승기탕의 혈당 및 혈압의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에 고지방 식이와 함께 도인승기탕 및 rosiglitazone을 각

각 투여하면서, 약물 처리 8주부터 16주차까지 2주에 한번씩 공복 혈당을 측정하였다. 그 결과, db/db 마우스에 고지방 식이를 실시한 군은 혈당을 측정하는 기간 동안 580mg/dl 이상을 유지하였다. 그러나 도인승기탕 및 rosiglitazone을 각각 투여한 군에서는 유의성 있는 혈당 감소효과를 보였다 (Fig. 1).

한편 16주 동안 wild type에 normal diet를 실시한 군은 특이할 만한 혈당 변화는 보이지 않았다. 또한 혈압을 측정한 결과에서도 rosiglitazone과 도인승기탕을 각각 투여한 군의 수축기 혈압이 고지방 식이를 한 db/db 마우스 군과 비교했을 때 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 2). 몸무게 및 식이, 식수 섭취량은 db/db 마우스 군에서 모두 별다른 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다 (data not shown).

2. 혈장 내 콜레스테롤 및 지질 대사에 미치는 영향

제 II형 당뇨병 환자에서 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증, 특히 고 중성 지방 혈증으로 20-60%의 빈도로 나타나며^{25, 26)}, 이러한 고지혈증은 죽상경화증의 주요 위험인자의 하나로 작용하여 결과적으로 허혈성 심질환을 비롯한 당뇨병의 심혈관계합병증의 발생에 영향을 미친다²⁷⁾.

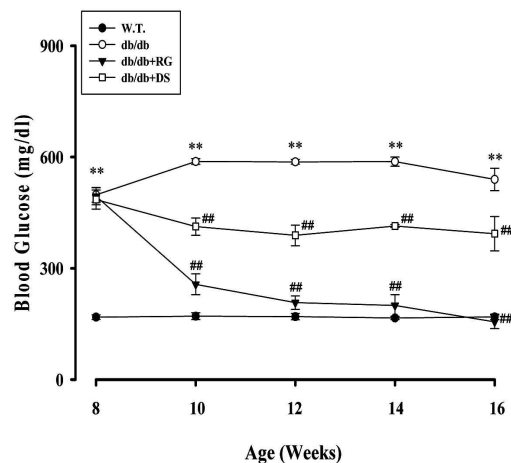


Fig. 1. Effect of the DST on levels of blood glucose of db/db mice fed with HFHC diet. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=10). **p < 0.01 vs. W.T.; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. db/db. W.T.; wild type control mice, RG; rosiglitazone, DS; Doinseunggi-tang

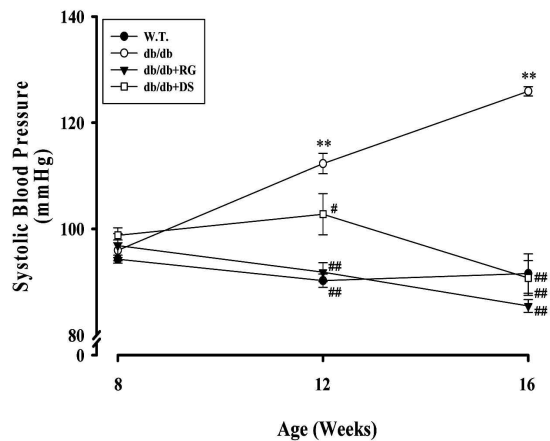


Fig. 2. Effect of the DST on SBP of db/db mice fed with HFHC diet. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=10). **p < 0.01 vs. W.T.; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. db/db.

또한 이들 환자들에서 혈 중 유리지방산의 증가는 간에서 VLDL의 생합성을 증가시키고 증가된 VLDL은 LDL의 증가를 유발한다^{28, 29}. 또한 유리지방산의 증가는 Randle 등에 의해 제시된 바와 같이 말초조직에서 인슐린에 대한 저항성을 증가시켜 혈중 포도당 농도를 상승시키는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서 혈중 중성지방 농도를 측정해 본 결과, db/db 마우스 군에서 증가된 중성지방의 함량이 도인승기탕을 투여한 군에서 감소함을 나타내었다. LDL의 함량은 db/db 마우스 군에서 증가하였으며 반면에 도인승기탕을 투여한 군에서는 유의성 있는 감소를 보였다. 그러나 HDL의 함량은 db/db 마우스 군, rosiglitazone 투여군, 그리고 도인승기탕 투여군 모두에서 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 3).

3. Creatinine 및 creatinine 제거율에 미치는 영향

혈장 내 creatinine 농도는 db/db 마우스에서 정상군에 비해 유의한 증가를 보였으며, 도인승기탕을 투여한 군에서는 db/db 마우스군과 비교했을 때 유의하게 감소되었다 (Fig. 10). Creatinine 제거율 (Ccr)을 측정한 결과 db/db 마우스 군에서 정상군과 비교했을 때 유의하게 감소하였고, 도인승기탕 투여군에서는 유의하게 회복되었다 (Fig. 4).

4. 혈관 장력의 변화

제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에서 도인승기탕 투여에 의한 혈관기능 개선 여부를 확인하기 위하여 흉부 대동맥을 적출 한 후, 혈관이완 실험을 수행하였다. db/db 마우스에 고지방 식이를 실시한 군 및 도인승기탕, rosiglitazone 투여군의 경동맥을 이용하여 PE, ACh 및 SNP에 대한 혈관이완 반응을 조사하였다. 그 결과, 혈관의 수축 반응에는 어떤 변화도 나타나지 않았으나, db/db 마우스에 고지방 식이를 실시한 군의 경동맥에서 내피세포 의존성 혈관이완 인자인 ACh에 대한 혈관이완 반응은 일반 식이를 투여한 군에 비해 현저히 감소하였다. rosiglitazone을 투여한 군은 고지방 식이에 의해 감소된 ACh에 대한 혈관이완 반응을 현저히 개선시켰고, 또한 도인승기탕과 함께

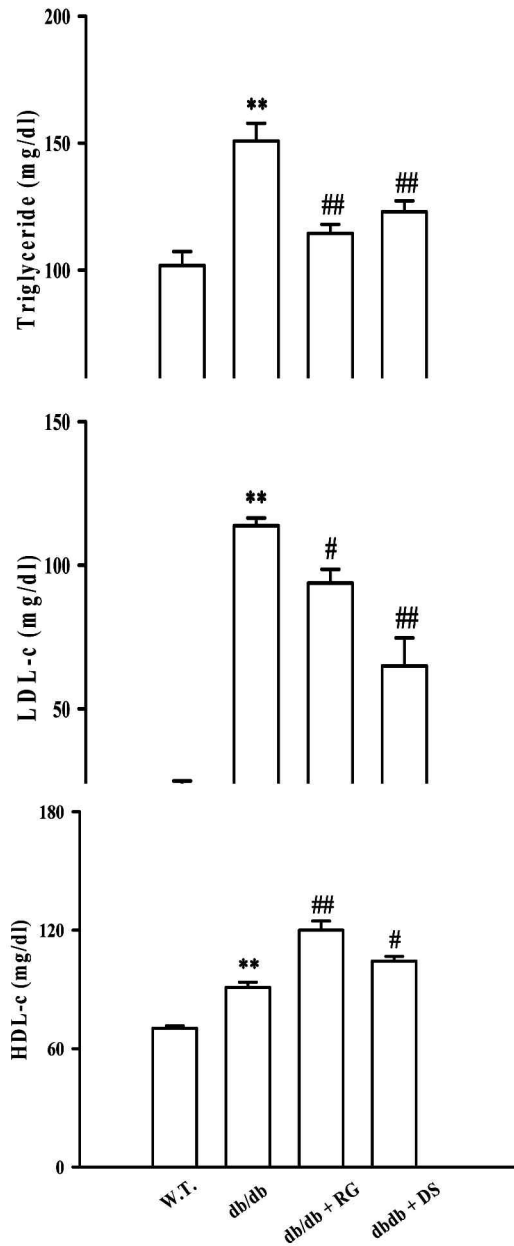


Fig. 3. Effects of the DST on triglyceride, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol in db/db mice fed with HFHC diet. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=10). **p < 0.01 vs. W.T.; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. db/db.

투여한 군은 감소된 ACh에 대한 혈관이완 반응을 유의성 있게 개선시켰다(Fig. 5A).NO donor인 SNP에 대한 혈관이완 반응 역시, db/db 마우스에

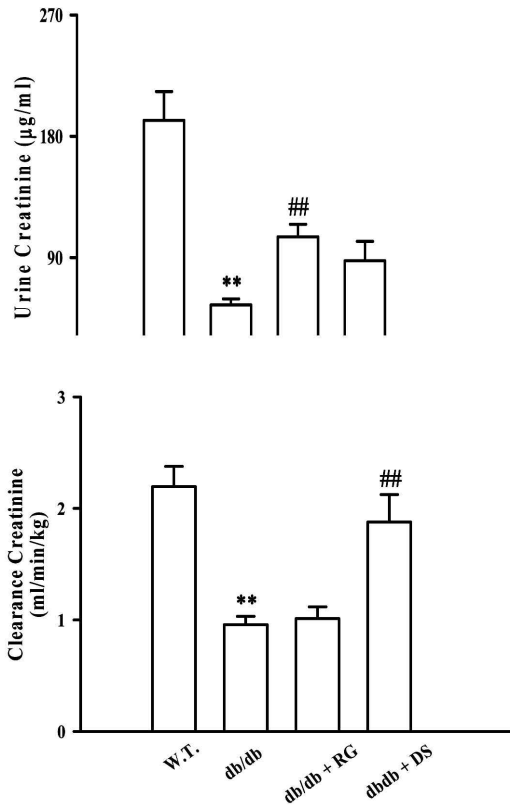


Fig. 4. Effect of the DST on urine creatinine, and creatinine clearance level of db/db mice fed with HFHC diet. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=10). **p < 0.01 vs. W.T.; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. db/db.

고지방 식이를 실시한 군과 비교 할 때, rosiglitazone 및 도인승기탕을 투여한 군 모두에서 유의성 있는 이완 효과를 나타내었다 (Fig. 5B). 그러므

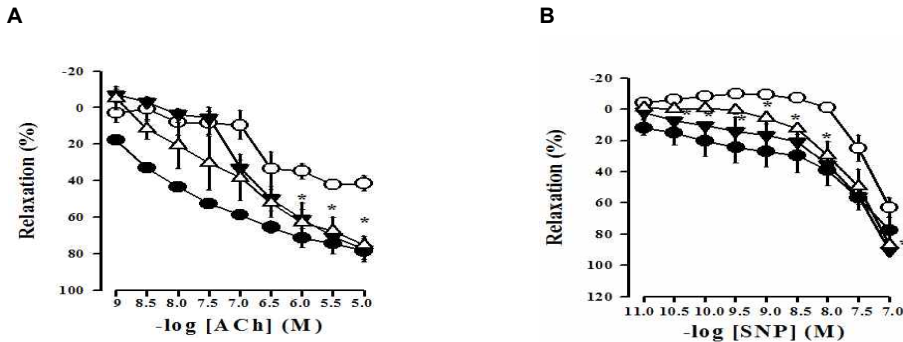


Fig. 5. Effect of the DST on vascular tone in thoracic aorta of db/db mice fed with HFHC diet. Effect of an DST on ACh (A) or SNP (B)-induced relaxation in thoracic aorta of db/db mice fed with HFHC diet. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=3). *p < 0.05, **p < 0.01 vs. W.T.; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. db/db.

로 제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에서 도인승기탕에 의한 혈관 이완 개선 효과를 확인하였으며, 이는 NO 의존적인 것으로 나타났다.

5. 혈관의 조직학적 변화

제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에서 도인승기탕 투여에 의한 혈관병변 억제효과를 분석하기 위하여 흉부대동맥을 적출한 후, hematoxylin & eosin (H-E) staining을 실시하였다. wild type 마우스에 일반 식이를 실시한 군에서는 정상적인 혈관 형태를 보이나, wild type에 고지방 식이를 실시한 군에서는 혈관 내막의 비후도가 증가하는 경향을 보이고 있다. db/db 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에서는 혈관 내막 및 중막의 비후도가 wild type에 고지방 식이를 실시한 군과 비교하였을 때 확연한 증가현상을 보이고 있으며 rosiglitazone을 투여한 군에서는 그 효과가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 도인승기탕을 투여한 군에서는 혈관 내막 및 중막의 비후도가 다소 감소하는 경향을 보이고 있으며, 내피 층 표면의 손상정도 역시 db/db 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에 비해 그 정도가 감소함을 보여주고 있다 (Fig. 6).

6. 혈관 염증 발현 마커 및 혈관 수축인자에 대한 발현 변화 분석

제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에서 도인승기탕 투여에 의한 혈관에서의 혈관 염증 마커의 발현 변화를 직접적으로 확인하기 위하여 immun-

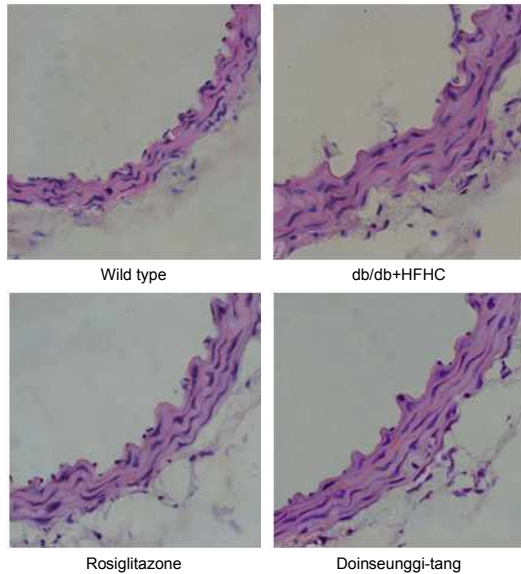


Fig. 6. Effect of the DST on thoracic aorta of db/db mice fed with HFHC diet in the morphology. Representative microscopic photographs in aorta of wild type mice with control diet and db/db mice fed with HFHC diet were stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 400$.

ohistochemistry를 수행하였다. 혈관염증 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 혈관 유착분자인 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 및 intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 발현 변화를 면역화학염색법을 이용하여 확인하였다. 그 결과, db/db 마우스에 고지방 식이를 실시한 군은 wild type에 고지방 식이를 실시한 군에 비해 VCAM-1 및 ICAM-1의 흉부대동맥 내피 단백질 발현이 확연히 증가하였으나, 도인승기탕을 함께 투여한 군에서는 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 rosiglitazone을 투여했을 때와 유사한 양상을 보였다. 도인승기탕을 함께 투여한 군의 혈압 변화에 따라 혈관 수축자인 ET-1의 변화를 알아보고자 immunohistochemistry를 실시하였다. 그 결과, 제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에 고지방 식이를 한 군에 비해 도인승기탕 및 rosiglitazone을 투여한 군에서 ET-1의 발현이 감소함을 확인 하였다 (Fig. 7).

IV. 고 찰

최근 제 II형 당뇨는 과도한 식품 섭취 및 운동 부족으로 인한 비만에서 비롯된 생활습관성질환 (lifestyle disease)으로 정의되며³⁰⁾, 당뇨병 환자의 90%가 Type 2형임에도 불구하고³¹⁾, 혈당 강하 및 합병증 등에 대한 명확한 치료 기전은 아직 발표되고 있지 않다. 도인승기탕 역시 단일 구성약재에 대한 혈행 개선효능에 대한 연구는 수행되었으나 복방 처방 자체에 대한 혈당 강하 및 혈관 이완, 혈관 염증 등에 대한 효능 연구는 아직까지 이루어지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 도인승기탕의 Type 2 당뇨동물 모델에서의 혈관 기능 장애에 미치는 영향을 구명하고, 합병증 예방에도 영향을 미칠 수 있음을 확인하고자 하였다. 이에 본 연구에서 제 II형 당뇨 모델인 db/db 마우스에 고지방 식이를 투여한 결과, 현저한 혈당의 증가를 초래하였다. 그러나 도인승기탕을 함께 투여한 군에서는 고지방 식이에 의한 혈당 증가를 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다. 당뇨병성 죽상경화의 초기단계에서 내피세포에서의 ICAM-1 및 VCAM-1과 같은 세포 유착분자의 발현이 증가한다. 그 결과로 단핵구 및 백혈구의 염증부위로의 침투가 증가하고 이들에 의한 염증 사이토카인의 분비는 혈관염증을 더욱 진행시킨다^{32, 33)}. 그러므로 이러한 세포유착인자의 발현 억제는 죽상경화를 예방 및 치료할 수 있는 좋은 치료목표가 될 수 있으며, 특히, 장기간 투여로 인한 부작용 면에서 안전한 천연물을 이용해 이들 분자들의 선택적인 억제로 죽상경화를 억제시켰다는 연구가 최근 많이 보고되고 있다. 본 연구결과에서 도인승기탕은 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스 모델에서 증가한 세포유착 분자인 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 현저하게 감소시켰다.

실제로 어떠한 동물실험이나 임상에서도 당뇨에 의한 직접적인 죽상경화 병변이 나타난다는 보고는 거의 없다. 그러나, 당뇨가 괴사성 지방핵 (necrotic lipid core) 형성에 기여하는 것은 사실로 보인다. 이는 제1형 당뇨환자에서 fatty streak

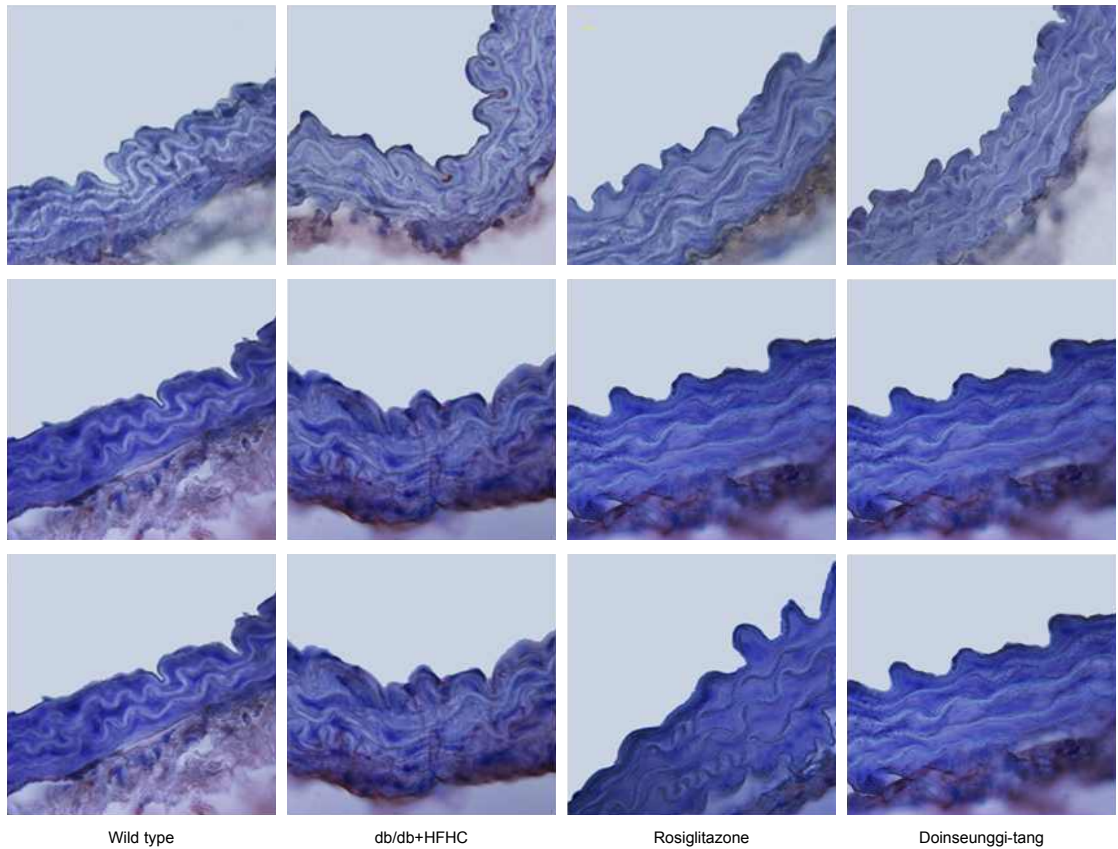


Fig. 7. Effects of the DST on VCAM-1, ICAM-1, ET-1 immunoreactivity in aortic tissues of db/db mice fed with HFHC diet. Representative microscopic photographs in aorta of wild type mice with control diet and db/db mice fed with HFHC diet were stained with anti-VCAM-1, anti-ICAM-1, or ET-1, respectively. Magnification $\times 1000$.

나 intima/media thickness와 같은 lesion initiation이 dyslipidemia와는 상관없이 활발히 나타난다는 사실에 기인한다^{34, 35}. 피사성 지방핵은 염증반응의 지속으로 인해 거품세포의 숫자가 증가하면서 일부가 피사하게 되고 죽은 세포들이 머금고 있던 지질이 배출되면서 형성된다. 이러한 피사성 지방핵은 평활근세포의 증식으로 생겨나는 fibrous cap과 함께 죽상경화반 (atherosclerotic plaque)을 형성하게 된다. 이때 염증반응이 지속된다면 대식세포들이 발현하는 금속함유 기질단백 분해효소 등을 포함한 각종 세포의 기질분해효소에 의해 죽상경화반이 파열되면서 혈관 내에 혈전(thrombus)이 형성되어 급성심근경색증의 발병으로 이어질 수 있다^{36, 37}. 그러므로 당뇨병에

기인한 죽상경화 병변은 장기간 당뇨에 의한 혈관 기능 장애가 지속되어 죽상경화반 (atherosclerotic plaque) 형성에 영향을 줄 것이라고 추측하고 있다. 본 실험에서도 장기적인 고혈당으로 인하여 초기 죽상경화증으로 대표될 수 있는 혈관기능 장애가 나타났으나 중증 죽상경화증을 나타내지는 못하였으며 이는 혈관 장력의 감소, macrophage의 증가, 그리고 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 혈관 내피세포 내 세포 유착분자의 발현 증가 등으로 설명할 수 있다. 또한 도인승기탕 투여가 TG나 LDL 콜레스테롤의 개선 및 혈당 강하효과를 나타내고 더 나아가 혈관 이완 및 항염증 효과를 나타내는 것으로 보아 초기 죽상경화에 효과를 준다고 사료된다. 혈장 내 트레아티닌 농도는

유의성없이 감소되었으나 청소율은 정상범위로 회복되는 것으로 보아 고지방 식이에 따른 신장 기능 부전을 도인승기탕 투여가 개선시키는 것으로 보여진다.

최근 연구에서는 비만 쥐에서 내피세포 손상에 의해 ACh에 대한 혈관이완 반응성이 현저히 손상됨을 보고하였다³⁸⁾. 또한, 고지방 식이는 흰쥐에서 인슐린 저항성과 체중 증가를 유도하고 이로 인해 혈관 내피세포가 손상된다는 보고가 있다³⁹⁾. 그러므로 본 연구자는 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스 모델에서 도인승기탕의 투여에 의한 혈관이완 반응성 변화를 검증하였다. 실험결과에서 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스는 흉부대동맥에서 ACh에 대한 혈관이완 반응이 현저히 감소하였다. 도인승기탕의 투여는 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스의 손상된 혈관 이완반응을 현저히 개선시켰다.

또한 실험결과에서 도인승기탕은 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스 모델에서 흉부대동맥의 내피층 표면이 거칠어지고, 중막 평활근이 비후되는 것을 개선시켰다. 따라서 도인승기탕은 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스에서 혈관 내피세포의 기능적인 향상이나 ACh에 대한 혈관이완 반응성을 증가시키는 것으로 사료되며 더 나아가 혈관기능 장애를 개선시키는 것으로 보여진다. 이는 도인승기탕이 제 II형 당뇨병 모델인 db/db 마우스 모델에서 혈관 장력의 조절에 아주 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보인다.

V. 결 론

도인승기탕은 고지방 식이를 실시한 db/db 마우스 모델에서 혈당을 감소시키고 혈관기능 장애를 개선시켰다. 즉 이러한 개선효과는 내피세포 의존적인 혈관이완을 통하여 세포유착분자의 발현 감소 및 혈관 내피세포의 기능적 개선을 통해 혈관염증을 개선시키거나 초기 죽상경화에 효과를 준다고 사료된다. 그러므로 도인승기탕에 대한

연구결과는 당뇨병성 혈관 합병증과 같은 혈관 질환에 있어 천연물을 이용한 새로운 치료 방향을 제시하는데 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 지원(2011)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Mandrup-Poulsen T. Diabetes. *Brit Med J*. 1998;316:1221-5.
2. Assmann G, Gullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk. The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease: a Worldwide view. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1819-24.
3. Reaven GM, Las A. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinemia, and coronary heart disease. *Diabetologia*. 1994;37:948-52.
4. Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia*. 2003;74:624-9.
5. Nandita S, Rajini PS. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem*. 2004;85:611-6.
6. 尹吉榮. 東醫學의 客觀化와 東西醫學 病名統一을 위한 方法. 서울:東洋醫學. 1976:7-15.
7. Zhao Z, Wang W, Guo H and Zhou D. Antidepressantlike effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. *Behav Brain Res*. 2008; 194:108-13.
8. Fu Y, Hsieh TC, Guo J, Kunicki J, Lee MYWT, Darzymkiewicz Z, Wu J. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1



- arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem Bioph Res Comm.* 2004;322:263-70.
9. 정영수. 桃仁承氣湯 투여가 Alzheimer disease model 쥐 (Tg-APPswe/PS1dE9 mouse)에 대한 기억 회복 및 신경세포 보호 효과. *동국대학교.* 2011.
 10. Tungyuan L, Yijian W, Weiwen K, Limen C, Yunting C, Yuehmin L, Fuujen T, Chunhsin L, Yeemun C, Eric YC L, Chihyang H, Yulan Y. Taohe Chengqi tang ameliorates acute liver injury induced by carbon tetrachloride in Rats. *Origin Experiment Res.* 2010;8:49-55.
 11. Oh Sj, Baek NI, Kim HY. Piceatannol, anti-oxidant compound isolated from the root of *Rheum undulaum* L. *J Kor Agri Chem Biotechnol.* 2001;44:208-10.
 12. 神農氏. 神農本草經. 臺北:文光圖書有限公司 1982:261-2.
 13. 李時珍. 本草綱目. 臺北:文光圖書有限公司 1979: 662-3.
 14. Ge RY, Zhou CH, She YC. In fluences of stigma croci and Semen persicae on function of ovary- uterus in pseudopregnant rats. *J Tradit Cin Med.* 1983;3:23-6.
 15. Kosuge T, Inshida H, Ishii M. Studies on active substances in the herbs used for oketsu in chinese medicine. II. On the anticoagulative principle in persicae. *Chem Pharm Bill.* 1985;33:1496-8.
 16. Sakamoto S, Kudo H, Kawasaki T, Kuwa K, Kasahara N, Sassa S, Okamoto R. Effects of a chinese herbal medicine, keishi-bukuryo-gan on the gonadal system of rats. *J Ethnopharmacol.* 1988;23:151-8.
 17. Zoladz P, Raudenbush B, Lielley S. Cinnamon perks performance. Paper presented at the Association for Chemoreception Sciences, held in Sarasota, FL 2004;4:21-5.
 18. Chung HR, Lee JY Kim DC, Hwang WI. Synergistic effect of panax ginseng and cinnamon blume mixture on the inhibition of cancer cell growth in vitro. *J. Ginseng Res.* 1999;23:99-104.
 19. Su L, Yin JJ, Zhou DCK, Moore J. YU L. Total phenolic contents, chelating capacities and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chem* 2007;100:990-7.
 20. 박성주, 정종길, 서상완, 황상욱, 김영우, 송달수, 채영석, 신민교, 송호준. CCK로 유발시킨 급성 췌장염에 대한 가미대황목단피탕의 효과. *대한본초학회지* 2005;20:59-65.
 21. 이승현, 박선동, 박원환. 고-Cholesterol 식이 생쥐에 미치는 계지복령환의 항산화효과. *동국한의학연구소 논문집.* 1999;8:35-49.
 22. 김홍숙, 김선영, 신길조, 이원철. 당뇨병성 신경인성 방광으로 인한 소변불리환자를 당귀승기탕 가미법으로 치료한 치험 1례. *한방성인병학회지.* 2000;6:13-9.
 23. 육동신, 홍무창, 신민규, 김완희. Thioacetamide에 의한 간 손상에 칠물후박탕이 미치는 영향. *동서의학.* 1983;20:12-22.
 24. Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest.* 1995;96:2065-70.
 25. Son HY. Lipid metabolism in diabetes mellitus. *J Korea Diabetes Assoc.* 1985;9:159-64.
 26. Fredric LD. Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diab Metab Rev.* 1990;6:47-61.
 27. Ganda OP. Pathogenesis of macrovascular disease in the human diabetic. *Diabetes* 1980; 29:931-42.
 28. Reaven GM. N-n0insulin-dependent diabetes mellitus, abnormal lipoprotein metabolism, and atherosclerosis. *Metabolism.* 1987;36:1-8.
 29. Kissebah AH, Alfarsi S, Evana DJ, Adams PW. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride & apolipoprotein-B kinetics in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* 1982;31:217-25.

30. Aronne LJ, Nelinson DS, Lillo JL. Obesity as a disease state: a new paradigm for diagnosis and treatment. *Clin Cornerstone*. 2009; 9:9-25.
31. Baek SH. Prevention of Type 2 diabetes. *Medical Postgraduates*. 2007;3:128-31.
32. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
33. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 1992;13:106-12.
34. Jarvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Rönnemaa T, Raitakari OT. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:493-8.
35. McGill HC Jr, McMahan CA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation*. 2001;103:1546-50.
36. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007;5:265-82.
37. Li G, Sanders JM, Phan ET, Ley K, Sarembock IJ. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2005;167:1511-1518.
38. Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Takeda R, Omata M, Fujita T, Nagai R, Kitamura T, Hirata Y. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:1770-6.
39. Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension*. 2008;51:352-9.