

## 인슐린 투여가 정상쥐의 대사에 미치는 영향\*

주진순 · 김종대 · 최 면 · 박영의\*

한림대학교 부설 한국영양연구소  
\*한림대학교 의학부 병리학교실

### Effect of Exogenous Insulin on The Metabolism of Normal Rat

Jin-Soon Ju, Jong-Dai Kim, Myeon Choe, Young-Euy Park\*

*Korea Nutrition Institute, Hallym University*

*\*Dept. of Pathology, College of Medicine, Hallym University*

#### =ABSTRACT=

The objective of this study was to determine the metabolic effect of exogenous insulin on Sprague-Dawley rats. In a short-term study, the rats were injected insulin and sacrificed at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 and 6hr, respectively. Another group of the rats were injected long-acting insulin everyday and sacrificed at 0, 10, 20 and 30 days, respectively

Levels of hemoglobin, hematocrit, plasma glucose, plasma protein, plasma albumin, plasma lipids, cholesterol were determined for each experimental group. Also microscopic observation of fat infiltration of liver and aorta performed. No significant abnormality was observed either at the short-term or at the long-term insulin injection on normal rats.

#### 서 론

당뇨병과 이에 동반된 합병증은 우리나라에서 중요한 건강문제로 대두되고 있다. 이것은 당뇨병 자체가 만성적인 경과를 취하는 질환이므로 장기간에 걸친 치료가 필요하다는 점 이외에 최근 급속한 경제발전과 식생활 개선에 따른 평균수명 연장으로 당뇨병의 발생빈도가 급격

히 증가하고 있는 실정이기 때문이다".

당뇨병은 고혈당 및 이에 수반되는 대사 장애를 특징으로 하는 질환군으로서 그 병인은 정확히 밝혀져 있지 않다. 이에 병태생리는 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍 및 조직에서의 작용저하, 즉 인슐린 저항성으로 인하여 당질뿐만 아니라 지방질, 단백질대사에 이상이 초래되고 전신적으로 증상 및 합병증이 동반되며, 특징적

접수일자 : 1989년 5월 3일

\* 이 연구는 1987년도 한림대학교 연구비 지원에 의해 이루어짐

으로 고혈당 및 당뇨가 오는 일련이 질환군으로 서<sup>2-3)</sup>치료를 하지 않을 경우에는 당뇨병성 ket-oacidosis, 비케톤성 당뇨병 고삼투압성 coma, lacticacidosis 등의 급성합병증 이외의 다수 만성 합병증으로 인해 생명을 위협받게 된다.<sup>2-4)</sup>

1979년 National Diabetes Data Group(NDDG)에 의한 당뇨병의 분류방법 및 진단기준에 의하면 Ketosis를 일으키기 쉬운 인슐린 의존형 당뇨병(IDDM or Type I D.M)과 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM or Type II D.M)으로 대별되고 hemochromatosis, calcific pancreatitis, cushing's disease와 같은 질환으로 유발되는 이차성 당뇨병이 있다.<sup>5-6)</sup>

당뇨병의 치료책으로써 인슐린 투여는 많은 논란이 되어 왔다. 현재 사용되고 있는 인슐린 요법은 당뇨병성 합병증의 발생을 지연시키고 생존기간을 증가시킬 수는 있으나 고혈당을 완전히 극복할 수 없다<sup>9)</sup>고 한다.

당뇨병에 인슐린 투여를 함으로써 야기되는 부작용으로서는 항체 형성으로 인한 인슐린 저항이나 알레르기반응<sup>10)</sup>등을 들 수 있다.

항체는 주로 anti-insulin Ig G antibody에 기 인하는데 Flier<sup>11)</sup>은 anti-insulin Ig이 인슐린 receptor와 직접 결합하거나, 또는 세포에 결합하여 receptor를 변형시킴으로써 인슐린 저항을 더욱증가 시킨다고 하였다.

그 밖에 Ammon<sup>12)</sup>등은 외부 인슐린 투여가 췌장의 인슐린 분비를 억제한다고 보고하였는데, 이것은 인슐린이 pentose phosphate shunt의 활성을 feed back하기 때문인 것으로 나타났다. 따라서 인슐린 투여에 따른 문제점을 해결하기 위하여 여러가지 방법이 강구되었는데<sup>13-14)</sup>인슐린 동물원의 선택, 단일물 인슐린 사용, 항체억제처방, 지속성 정맥 인슐린 확산법 등이 그것이지만 근본적인 기작이나 문제점에 대해서는 명확한 해답을 얻지 못하는 실정이다.

본 실험에서는 인슐린 투여가 normal rat의 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 인슐린을 단기와 장기간에 걸쳐 투여한 후 insulin tolerance

test와 함께 혈청학적, 조직학적 변화를 비교 관찰하였다.

## 실험방법

### 1. 실험동물 및 실험단계

평균 체중 280~300g의 생후 10주되는 Sprague Dawley rat 84마리를 한림대학교 실험 동물부로부터 공급받아 일반고형사료(제일사료 Co.)로 실험기간중 사육하였고 사육실온도는 24~26℃, 습도는 60%로 유지되었다. 실험은 두가지 방법으로 나누어져 각각의 인슐린 투여효과를 관찰하였다.

#### A. Acute phase에서의 인슐린 투여 효과(이하 실험A라 칭함)

쥐들은 7마리를 한군으로 하여 임의로 모두 8군으로 나누고 한군은 대조군으로 실험 시작 시 희생시키고(0분), 나머지 7군은 동시에 D.S. insulin(동신 Pharm Co.)을 1마리당 1unit 복강 주사로 투여하고 투여가 끝난 쥐들은 다시 cage에 넣어져 희생되는 시간까지 식이와 물을 자유로이 섭취토록 하였다. 주사한 지 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6시간 후에 각각 해당되는 군의 쥐를 희생시켰다.

#### B. Chronic phase에서의 인슐린 투여 효과(이하 "실험B"라 칭함)

무작위적으로 선택한 7마리의 백쥐를 한 군으로 하여 모두 4군으로 나누어 한군은 대조군으로 실험시작 당일 희생시키고(0일) 나머지 3군은 N. P. H(Neutral Protamine Hagedorn) Insulin(동신Pharm Co.)을 1마리당 1unit 매일 일정시간에 복강 주사하였다. 시작한 날로부터 각각 10일, 20일, 30일되는 날에 12시간동안 절식시킨 후 희생하였다.

### 2. 실험방법

쥐들은 ethyl-ether로 마취시킨 다음 복강을

## 실험결과 및 고찰

열고 복부동맥으로부터 혈액을 취하고 그 일부는 hemoglobin, hematocrit 측정을 위해 heparin 처리하였고 나머지는 한시간동안 상온에서 방치한 후 3000rpm에서 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 간과 대동맥은 떼어낸 즉시 생리 식염수에 씻어서 여과지상에서 수분을 제거한 후 10% neutral formalin 용액에서 고정시켜 조직 검사용으로 보관하였다.

### 가. 혈청의 생화학적 관찰

① 총지질 함량 : Sulfo-phosphovanillin법<sup>9)</sup>에 의하여 혈청에 진한 황산을 가한 후 수조에서 10분간 끓여phosphovanillin 시약으로 발색시켜 540nm에서 흡광도를 구해 표준액과 비교하였다.

② 중성지방과 인지질 함량 : 효소법에 의한 Mizuho-Medy사의 Kit를 사용하여 측정하였다.

③ 총 콜레스테롤과 free 콜레스테롤 : 효소법에 의한 Wako사 Kit를 각각 사용하여 측정하였다.

④ Glucose : Glucose oxidase법<sup>10)</sup>에 의한 Mizuho - Medy사의 Kit를 이용하여 측정하였다.

⑤ 혈청 단백질과 알부민 : 단백질은 Lowry 법<sup>11)</sup>에 의하여 측정하였고 알부민은 bromocresol 법<sup>12)</sup>으로 측정하였다.

⑥ Hematocrit(Ht)과 hemoglobin(Hb) : Microhe-matocrit 법과 cyanmethemoglobin법<sup>13)</sup>에 의하여 각각 측정하였다.

각 실험결과는 군별로 사료를 합하여 2회 반복한 실험치의 평균치로 표시하였다.

### 나. 조직학적 관찰

내부조직을 관찰하기 위하여 10% neutral formalin으로 고정된 간과 aorta는 automatic tissue processor(Reichert-Jung, Histokinette 2000)로 처리하였다. 처리된 조직은 microtome으로 3~4  $\mu$ m로 절편을 만들고 canada balsam으로 봉하였다. 또 조직은 H&E로 이중염색한 후 Olympus BH-2광학 현미경(100 $\times$ )에서 지방침착유무를 관찰하고 사진 촬영하였다.

## 1. 혈당 변화

가. Acute phase에서의 변화 : Fig 1a의 insulin tolerance curve에서와 같이 인슐린 투여 후 0.5시간만에 인슐린 투여전 혈당의 50% 수준으로 떨어졌고, 1.5시간만에 최초 혈당이 11%로 최저를 나타내어 혈당 감소율은 1.52mg / 100ml / min였으며, 4시간 후에는 처음 수준으로 복귀되어 정상곡선<sup>14)</sup>형태에서 벗어나지 않았다. 이와 같은 결과는 이<sup>20)</sup>등이 비의존성 당뇨병 환자에 인슐린을 투여했을때 혈당을 조절할 수 있다는 보고와도 일치한다.

나. Chronic phase에서의 변화 : Fig. 1b에서와 같이 혈당 수준은 인슐린 투여와 별다른 상관관계를 보이지 않았다. 따라서 장기적인 외부 인슐린의 투여가 normal rat의 공복혈당에 큰 변화를 주지 않을 것임을 알 수 있었다.

## 2. Hb, Ht, 혈청단백질, 혈청 알부민

실험 A에서 인슐린 투여후 각 시간별 Hb와

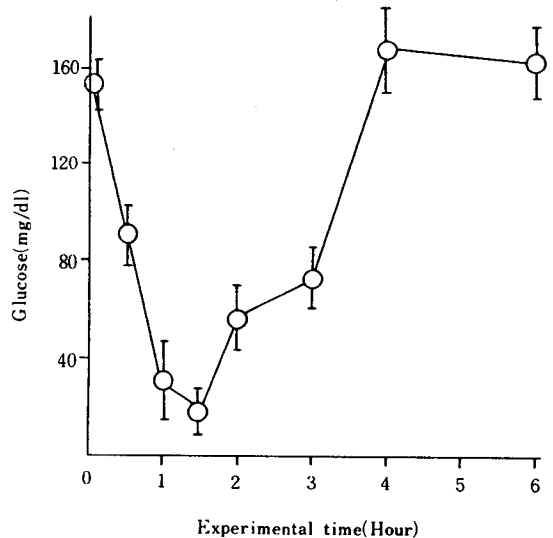


Fig. 1 a. Changes of serum glucose concentration after D.S. insulin injection

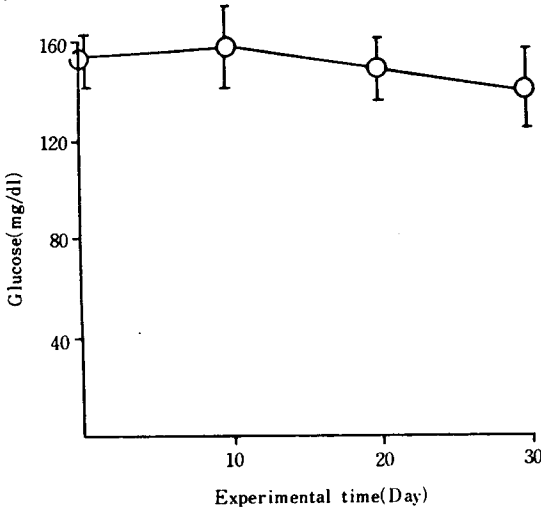


Fig. 1 b. Changes of serum glucose concentration after NPH insulin injection

Ht의 값은 인슐린 투여전과 별 차이가 없었고 (각각  $P>0.1$ ,  $P>0.4$ ), 혈청 단백질과 알부민도 각각  $7.0 \pm 0.4$  및  $2.5 \pm 0.3$ 에 수렴하여 인슐린 투여 전의  $6.8 \pm 0.2$  및  $2.2 \pm 0.1$ 과 비교하여 큰 차이가 없었다 (Table I).

실험B에서는 인슐린 투여 후에 Hb, Ht, 혈청 단백질, 혈청알부민은 각각  $13.0 \pm 1.1$ ,  $39.1 \pm 0.6$ ,  $6.9 \pm 0.2$ ,  $2.5 \pm 0.22$  인슐린 투여 전의  $14.1 \pm 0.2$ ,  $39.6 \pm 0.4$ ,  $6.9 \pm 0.3$ ,  $2.4 \pm 0.2$ 와 거의 차이가 없었다 (Table II).

### 3. Serum lipid levels

가. Acute phase에서의 경우 : 인슐린 투여후 총지질 함량은 0.5시간에서 2시간 사이에 투여 전보다 평균 30%의 증가를 보였으며, 그후 3시간에서 부터 감소하기 시작하여 4시간에서는 투여전의 값으로 복귀되었다. 중성지방은 1.5시간만에 약간 증가하는 경향을 나타냈는데 이는 인슐린 투여후 지방세포에서 유리지방산을 re-esterification 하는 것을 촉진<sup>20</sup>시킴에 따라 일어나는 것으로 사료된다.

인지질은  $108.6 \pm 16.6$ 으로 인슐린 투여 전과 유의적 ( $P>0.05$ ) 차이가 없었다 (Fig. II a).

총 콜레스테롤 함량은 Fig. II b에서와 같이 0.5시간에서 인슐린 투여 전보다 약 28% 증가하였다. 그후 급격히 감소하여 3시간에서 최저치를 나타냈는데 이것은 에스터 상태의 콜레스테롤 감소가 주된 원인인 것으로 사료된다. Free 상태의 콜레스테롤 함량은 큰 증감을 나타내지 않았는데 2시간대에는 free-콜레스테롤 양이 에스터형보다 오히려 높게 나타났으며, 3시간대에는 free형이 총 콜레스테롤의 60%를 차지 하며 총콜레스테롤 중 70%가 에스터형인 정상수준과는 상반되는 경향을 보였다.

HLD-콜레스테롤의 경우 증감의 폭은 적으나 총 콜레스테롤 변화와 같은 양상을 보였다 (Fig. II b). 결국 인슐린 투여한 후 1시간 내에는 측정된 모든 지질 수준이 약간 증가하였고, 시간

Table I. Levels of Hb, Ht, Total Protein, Albumin in Rat Serum in Experiment A

Time after Insulin Injection (min)	Hb (g/100 ml)	Ht (%)	Total Serum Protein (g/100 ml)	Serum Albumin (g/100 ml)	A/G Ratio
0	$14.1 \pm 0.6$	$39.4 \pm 0.7$	$6.8 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.1$	2.1
30	$12.6 \pm 0.6$	$36.9 \pm 0.3$	$6.4 \pm 0.4$	$2.0 \pm 0.2$	2.2
60	$12.0 \pm 0.2$	$39.8 \pm 2.0$	$7.3 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.2$	2.1
90	$13.4 \pm 0.2$	$36.3 \pm 0.2$	$7.2 \pm 0.6$	$2.6 \pm 0.3$	1.5
120	$13.4 \pm 0.5$	$41.2 \pm 2.0$	$7.1 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.2$	1.7
180	$13.4 \pm 0.6$	$37.8 \pm 0.2$	$7.1 \pm 0.5$	$2.4 \pm 0.4$	1.5

\* Values are means of duplicate assays from the three rat-pooling samples

Table II. Levels of Hb, Ht, Total Protein, Albumin in Rat Serum in Experiment B

No. of Days After Insulin Injection	Hb(g/100 ml)	Ht(%)	Total Serum Protein (g/100 ml)	Serum Albumin (g/100 ml)	A/G Ratio
0	14.1 ± 0.2	39.6 ± 0.4	6.9 ± 0.3	2.4 ± 0.2	1.9
10	14.1 ± 0.3	42.2 ± 1.0	6.7 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.9
20	12.0 ± 0.3	37.6 ± 0.3	7.0 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.7
30	13.0 ± 0.3	37.6 ± 2.4	7.0 ± 0.5	2.2 ± 0.4	1.6

\* Values are means of duplicate assays from the three rat-pooling samples

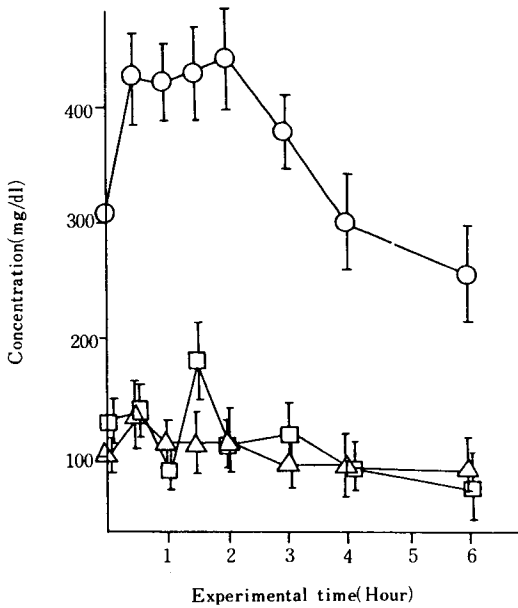


Fig. II a. Changes of total lipid, triglyceride, phospholipid in Experimental A  
 ○ Total lipid  
 □ Triglyceride  
 △ Phospholipid

의 경과에 따라 감소하는 경향을 나타냈다.

나. Chronic phase에서의 경우 : 만성적 인슐린 투여에 따라 총지질 함량은 인슐린 투여 20 일까지는 큰 변화가 없었으나 30일째에서는 인슐린 투여전보다 22.3% 정도 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. III a).

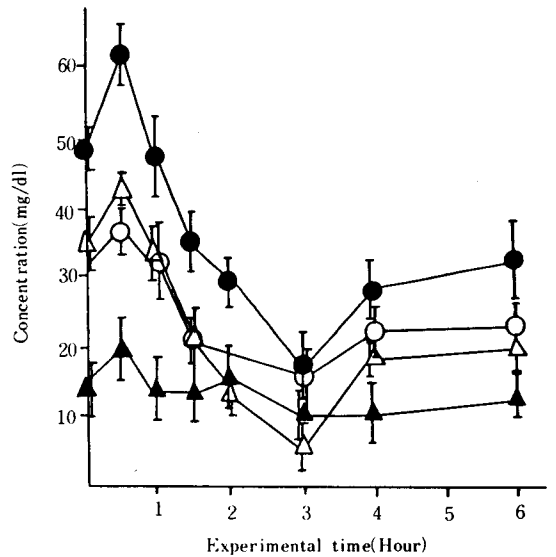


Fig. II b. Changes of total cholesterol, cholesterol ester, free cholesterol and HDL-cholesterol,  
 ● Total cholesterol  
 ○ HDL-cholesterol  
 △ Cholesterol ester  
 ▲ Free cholesterol

인지질의 경우에는 88.9 ± 5.92로 인슐린 투여 전의 수준에 수렴하였고 중성지질은 날짜의 증가에 따라 다소 증가하였으나 일실험군의 매우 큰 개체차이 때문에 유의적 증가는 보이지 않았다. 총지질 함량의 감소나 중성지방의 증가가 인슐린 투여에 의한 변화인지, 성장에 따른 결

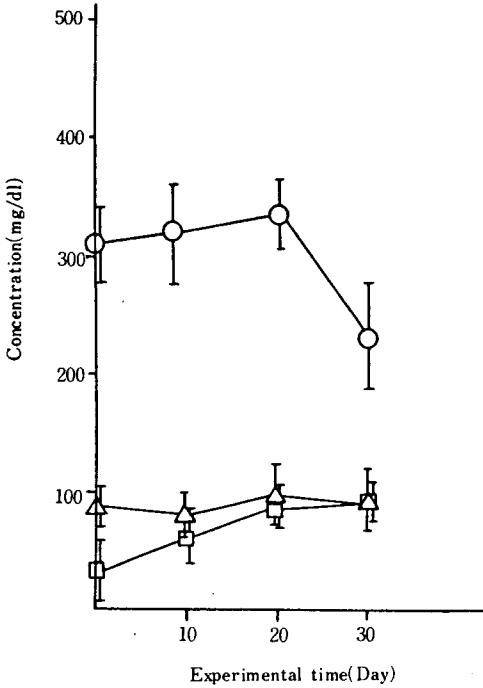


Fig. III a. Changes of total lipid, triglyceride, phospholipid in Experimental B  
 ○ Total lipid  
 □ Triglyceride  
 △ Phospholipid

과인지는 대조군을 통해 차후 연구되어야 할 것이다.

총 콜레스테롤, free콜레스테롤, 콜레스테롤 에스터는 인슐린 투여후 실험주기에 따라 뚜렷한 영향을 받지 않았고 HLD-콜레스테롤도 인슐린 투여전과 차이가 ( $P > 0.01$ ) 없었다 (Fig. III b) 일반적으로 당뇨병환자의 경우 인슐린을 투여하여 혈당을 안정화시키면 이에 따라 지질이나 지단백질의 대사도 안정화되므로 동맥경화의 위험을 줄일 수 있다고 한다. Dunn<sup>14)</sup> 등은 10명의 Type I 당뇨병 환자에게 지속적 정맥 인슐린 확산법으로 26주간 인슐린을 투여한 결과 중성지방, 총콜레스테롤은 유의적 감소를 보인 반면 HDL-콜레스테롤은 유의적으로 증가하여 동맥경화의 위험을 훨씬 낮추어 주었다고 하

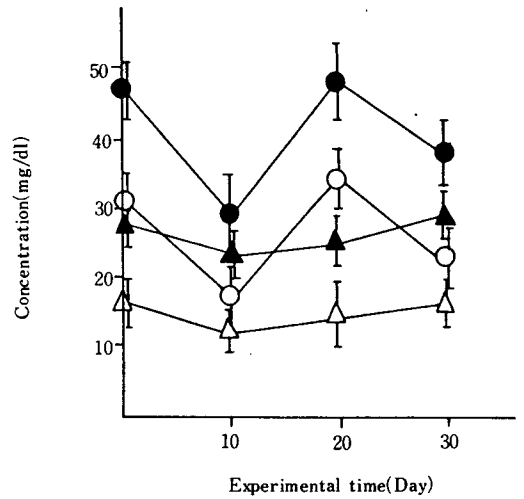


Fig. III b. Changes of total cholesterol, cholesterol ester, free cholesterol and HDL-cholesterol in Experimental B  
 ● Total cholesterol  
 ○ cholesterol ester  
 △ Free cholesterol  
 ▲ HDL-cholesterol

였다. 또한 정상 쥐에 인슐린을 투여했을 때 투여된 인슐린이 쥐 허파에 당지질의 전환을 가속시킴을 나타내었다. 그러나 시간이 흐를수록 그 효과는 유의적으로 감소하므로 단기적인 증상으로 볼 수 있었다<sup>21)</sup>

오랜 시간동안 인슐린을 투여했을 때 총 지질과 중성지방의 변화를 제외한 별다른 혈청 지방의 변화를 볼 수 없었으므로, 정상 백서의 경우 인슐린 투여가 당활성도를 변화시켜 지방대사에 영향을 주는 효과, 즉 장기적으로는 어떤 지방의 대사의 이상을 초래하지 않을 것으로 사료된다.

#### 4. Chronic phase에서의 간과 aorta의 조직학적 관찰

인슐린 장기투여후 예상되는 insulin lipogenesis 여부를 조사하기 위해 간과 aorta의 지방침착 여부를 관찰한 결과는 Fig. IV와 Fig. V와 같다.

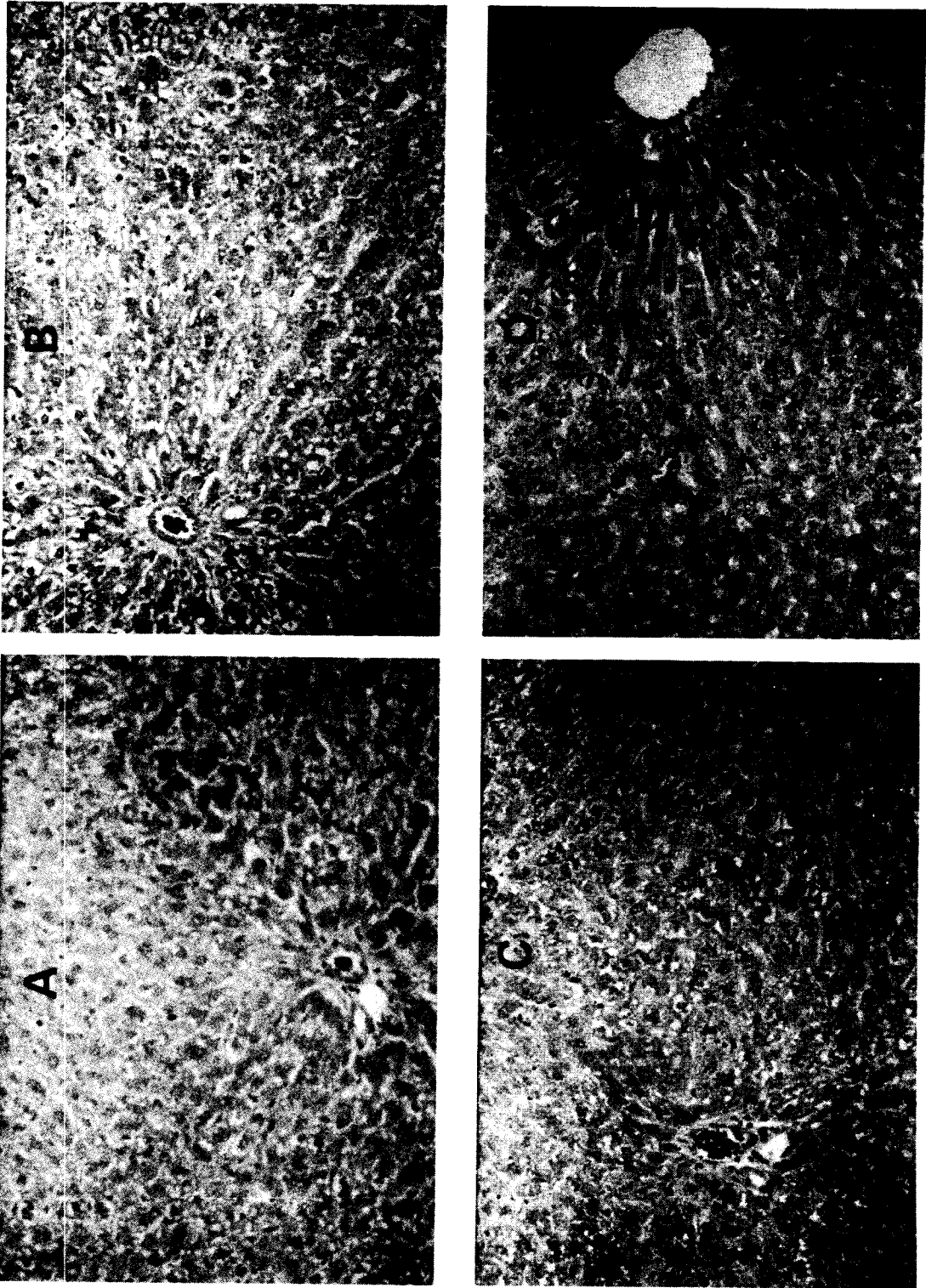


Fig. IV. Photomicrograph of liver tissues after NPH insulin injection.  
A : 0 day B : 10 days of NPH insulin injection  
C : 20 days of NPH insulin injection  
D : 30 days of NPH insulin injection

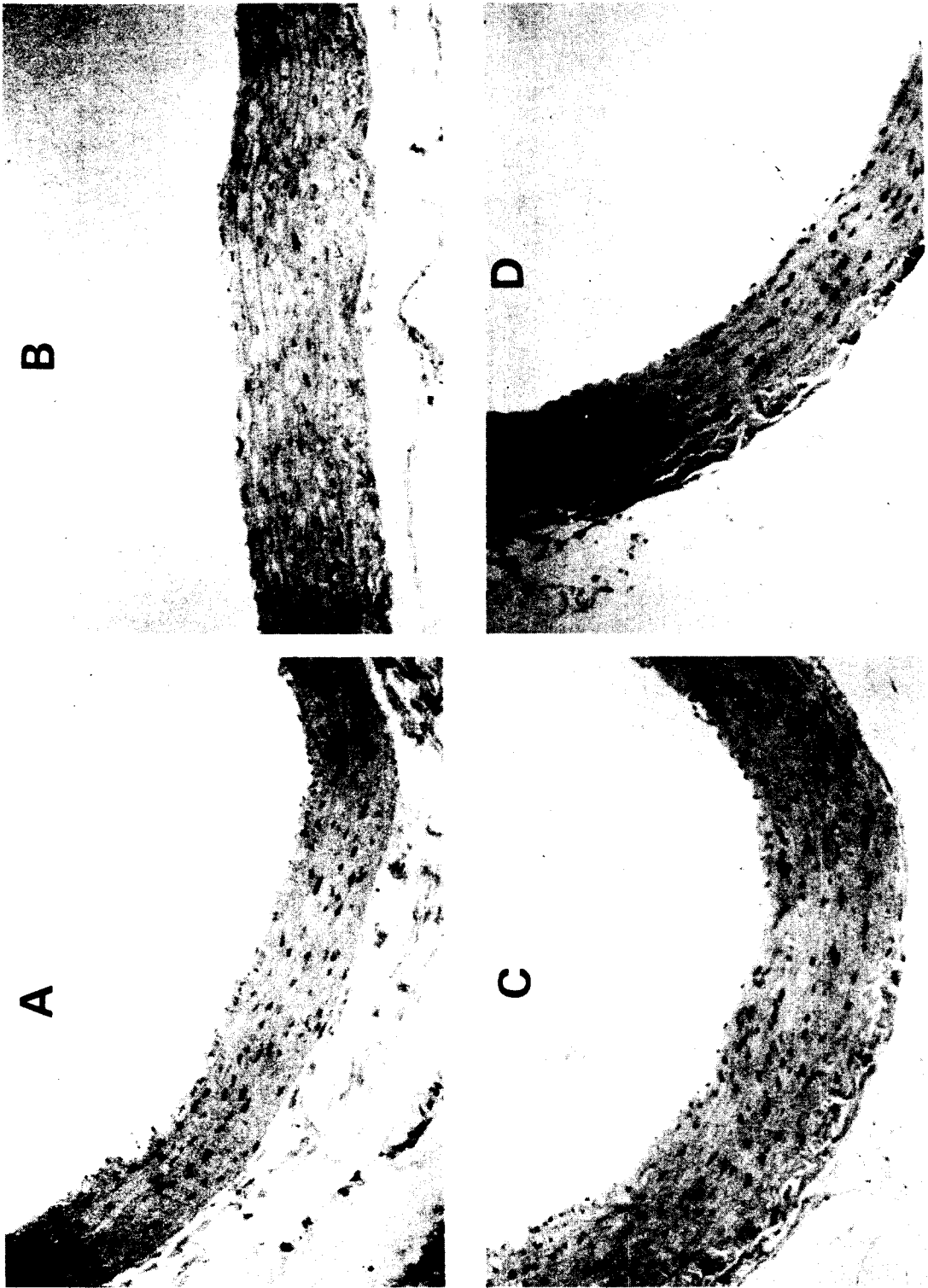


Fig. V. Photomicrograph of aorta tissues after NPH insulin injection  
A : 0 day B : 10 days of NPH insulin injection  
C : 20 days of NPH insulin injection  
D : 30 days of NPH insulin injection



각 조직은 인슐린을 투여하기 전(A)과 비교하여 10일(B), 20일(C), 30일(D) 후에도 지방 침착의 뚜렷한 변화는 보이지 않았다.

### 요 약

본 연구는 인슐린 투여가 생체내에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위한 기본단계로서 생후 약 10주령되는 정상쥐에 인슐린을 복강 주사한 뒤 혈청내 변화와 조직학적 변화를 조사하였다.

결과를 요약하면 다음과 같다.

가. Acute phase에서의 인슐린 투여 효과

① 인슐린 주사후 1.5시간만에 혈당치는 최저를 나타냈으나 그후 점차 증가하여 4시간후에는 처음 수준으로 복귀하였으며 Hb, Ht, 혈청 단백질과 알부민 등은 인슐린 투여에 의해 큰 변화를 보이지 않았다.

② 혈청 총지질, 중성지방은 인슐린을 주사한지 2시간까지는 약간 증가하다 차츰 감소하였고, 혈청 콜레스테롤은 감소하다가 4시간 이후에 다시 증가추세로 바뀌었다. 그러나 인지질은 별다른 변화를 보이지 않았다.

나. Chronic phase에서의 인슐린 투여 효과

① 인슐린 투여에 따라 공복 혈당치는 큰 영향을 받지 않았으며, Hb, Ht, 혈청 알부민과 단백질 등은 실험기간중 별다른 변화가 없었다.

② 혈청 총지질은 인슐린 투여 20일까지는 큰 변화가 없었으나 그후 30일째는 처음 수준의 절반으로 감소함을 보였다. 그러나 중성지방, 인지질, 혈청콜레스테롤 등은 뚜렷한 증가나 감소가 없는 경향을 보였다.

③ 인슐린 투여가 간과 aorta의 지방 침착에 미치는 영향은 뚜렷한 변화가 없었다.

### References

- 1) 민현기, 유형준, 이흥규, 김웅진. *Changing patterns of the prevalence of diabetes mellitus in Korea*. 당뇨병 6 : 1, 1981

- 2) Cecil. *Textbook of medicine 15th ed.* WB saunders Co. philadelphia, 1969, 1979
- 3) Harrison. *Principles of international Medicine. 9th ed.* McGraw-Hill Book Co., N. Y, 1741-1745, 1980
- 4) Rifkin H. *Why control diabetes? Med clin N A mer* 62 : 74, 1978
- 5) Anderson. T, Schein PP, McMEnamin MG, Cooney DA. *Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. J Clin Invest* 54 : 672-677, 1974
- 6) Aryayev N L. *Extract of Aloe-scientific and Clinical data. New Scientific Discoveries.* 84-87, 1969
- 7) Bennett PH. *The diagnosis of diabetes : New International Classification and diagnostic criteria. Ann Rev Med* 34 : 295-309, 1983
- 8) Beppu H, Maruta K, Kurner T, Kolb H. *Diabetogenic action of streptozotocin : essential role of membrane permeability. Acta endocrinologica* 114 : 90-95, 1987
- 9) Service FJ, Molnar GD, Rosevear JW, Ackerman E, Gatewood LC, Tayler WF. *Mean amplitude of glycemic excursion, a measure of diabetic instability. diabetes* 19 : 644, 1970
- 10) Elenbaas RM, Forni PJ. *Management of Insulin Allergy and Resistance. Am J Hosp pharm* 33 : 491-497, 1976
- 11) Flier JS, Kahn CR, Roth J, Bar RS. *Antibodies that impair insulin receptor binding in an unusual diabetic syndrome with severe. insulin resistance science*, 190(4209) : 63-65, 1975
- 12) Ammon HPT, Versphohl E. *Pyridine Nucleotide in pancreatic Islets During Inhibition of Insulin Resistance by Exogenous Insulin. Endocrinology* 99: 1469-1476, 1976
- 13) Joslin, Elliott Proctor, *Joslin's Diabetes Mellitus*, 48, 1985
- 14) Frings CS, Dunn RT. *A colorimetric Method for Determination of Total Lipids Baed on the sulfop-*

- hosphovanillin reaction Am J Clin path* 53 : 89-91, 1970
- 15) Bauer JD, Ackermann PG, Toro G. *Clinical Laboratory Methods*. The C.V. Mosby, Co., Saint Louis, 235. 1977
- 16) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 17) Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. *Albumin standards and Measurement of Serum albumin with Bromocresol Green. Clin Chem Acta* 31 : 87-96, 1971
- 18) 이삼열, 정인섭. 임상병리검사법. 연세대학교 출판부 73-74, 1985
- 19) 이병욱, 윤형구, 양인명, 김진우, 김영설, 김광원, 김선우, 최영길. 인슐린 비의존형 당뇨병 환자에게 인슐린 치료후 인슐린 분비능의 변화. 당뇨병9(2) : 217-222, 1985
- 20) 김선우. 당뇨병에서의 지질대사 이상. 당뇨병5(1) : 43-48, 1979
- 21) Moxley MA, Longmore WJ. *Effect of Experimental Diabetes and Insulin on Lipid Metabolism in the isolated perfused Rat Lung. Biochem Biophys acta* 488 : 218-224, 1977