

Streptozotocin 유발 당뇨쥐 신장조직의 항산화계에 미치는 Vitamin E의 영향

곽오계 · 양정아* · 이순재*†

대구과학대학 간호과

*대구효성기톨릭대학교 식품영양학과

Effects of Vitamin E on the Antioxidative Defense System of Kidney in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Oh-Gye Kwag, Jeong-Ah Yang* and Soon-Jae Rhee*†

Dept. of Nursing Science, Taegu Science College, Taegu 702-722, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung,
Kyungsan 712-702, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of vitamin E on the antioxidative defense system of kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats weighing 100 ± 10 g were randomly assigned to one normal and three STZ-induced diabetic groups, which were subdivided into vitamin E free diet(DM-0E group), 40mg vitamin E per kg diet(DM-40E group) and 400mg vitamin E per kg diet(DM-400E group). Vitamin E level of normal group was 40 mg per kg diet. Diabetes was experimentally induced by intravenous injection of 55mg/kg of body weight of streptozotocin(STZ) in citrate buffer(pH 4.3) after 4 weeks feeding of experimental diets. Animals were sacrificed at the 6th day of diabetic states. There were no significant on body weights, food intakes, and food efficiency ratio before the diabetic occurrence. But after the injection of STZ, body weights and food efficiency ratios were significantly decreased and the food intakes was increased. Kidney weights were significantly increased in diabetic groups compared to normal group. However, there were no significant differences among the diabetic groups. Plasma insulin levels of diabetic groups were significantly decreased, whereas, blood sugar levels were increased compared to that of normal group. There were no significant differences among diabetic groups in plasma insulin and glucose levels. Activities of superoxide dismutase(SOD) in DM-0E and DM-40E groups were significantly decreased by 33% and 27%, respectively, compared to normal group. But that of DM-400E group was increased by 35% compared to DM-0E group. Activity of glutathione peroxidase(GSHpx) in DM-0E group was decreased by 20% compared with normal group. GSHpx activity in DM-400E group was increased by 29% compared to normal group. The contents of vitamin E in kidney were 58% and 49% lower in DM-0E and DM-40E group, respectively, than normal group. There was no significant difference in renal vitamin E contents between DM-400E group and normal group. The contents of superoxide radical(O_2^-) in kidney were 150% and 98%, respectively, higher in DM-0E and DM-40E groups than normal group. DM-400E and normal groups were similar levels in their superoxide radical contents of kidneys. These results indicate that vitamin E functioned as chain breaking antioxidant in kidney such as in other tissues.

Key words: vitamin E, kidney, antioxidative defense system, superoxide radical

서 론

최근 우리나라에서는 급속한 경제성장과 더불어 식생활의 서구화 및 생활양식의 변화에 따른 각종 성인병 환자가 증가되고 있으며 그 중에서도 당뇨병은 특히 선

진국과 개발도상국에서 급증세를 보이고 있다(1).

당뇨병 환자에서는 거의 대부분 눈, 신경 및 신장 등의 병변과 심혈관계질환을 동반하고 그 외에도 여러 가지 대사성질환을 초래한다. 따라서 당뇨병 환자에서의 합병증으로는 시력장애, 백내장, 실명과 신부전, 및

* To whom all correspondence should be addressed

신경장애, 뇌졸중, 심근경색, 동맥경화등의 혈관성 합병증 발생율이 높다(2-4). 이러한 당뇨병 합병증중에서도 신장질환은 그 심각성에 비해 이에 대한 병리기전과 관련된 영양학적 측면에서의 연구는 미흡한 상태이다.

이와 관련된 최근 또 다른 연구에서는 당뇨병성 만성 합병증 발생에 산화적 스트레스가 관여한다는 견해가 주목을 끌고 있고 또한 당뇨병 환자와 실험동물 모델에서 다양한 항산화 방어기전의 활성 변화가 관찰되었다(5). 당뇨병에서는 고혈당의 지속화와 만성화로 여러 가지 자유 라디칼의 생산이 증가되고, 반응성이 높은 이들 물질에 의해 혈관내피세포가 손상되면서 각종 혈관성 합병증이 발생된다고 보고되었다(6). 고혈당에 의한 산화성 스트레스를 방어해 내기에는 항산화 효소의 양과 활성이 불충분했고, 또한 그들 효소 사이에 유지되고 있던 균형상태가 깨지는 것 또한 중요한 병인으로 작용하며 특히 심혈관계 질환과 깊은 관련이 있다고 알려져 있다(7).

생체내에서 생성된 superoxide radical(O_2^-)과 같은 자유 라디칼은 superoxide dismutase(SOD)에 의해 과산화수소($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로 전환되고 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase(GSHpx)에 의해서 무독한 H_2O 로 전환되며, 이과정에서 세포는 산소독으로부터 보호된다. 그러나 당뇨병과 같은 병리적 상태에서는 자유 라디칼 생성 자체의 증가와 이에 대한 방어기전의 저하로 산소 자유 라디칼에 의한 조직 손상의 가능성이 높으며(8), 이러한 자유 라디칼 발생은 만성합병증 발생에 관여하는 주요 기전 중 하나로 생각된다. 따라서 당뇨병 환자에서 이러한 자유기를 제거하거나 이에 의한 산화성 손상을 막을 수 있는 항산화계의 강화는 만성합병증에 대한 중요한 예방과 치료방법이 될 수 있다.

한편 최근 자유 라디칼 생성이나 지질과산화를 방어하는 항산화기구를 강화시킬 수 있는 물질로 vitamin E, A, C, β -carotene 등의 여러 가지 항산화물질을 대상으로 한 연구가 다방면으로 진행되고 있다(6,7,9). Yung (9)의 당뇨쥐를 대상으로 한 선행연구에서 비타민 E가 간조직의 항산화계를 강화시키고 혈중 지질과산화물의 축적을 감소시켰음을 보고하였다.

이상을 종합해 볼 때 신장조직은 산화적 스트레스에 민감하여 과산화적 손상이 초래되기 쉽고 또한 당뇨병성 만성 합병증 유발율이 높고 당뇨병성 신증으로 인한 사망 순위가 높은 기관인데도 불구하고 신장조직을 대상으로 한 이러한 연구는 미진한 상태이다.

그러므로 본 연구에서는 항산화적 생리기능이 뛰어나고 또 일부 그 효과가 입증된 비타민 E를 대상으로

그 작용기전을 확립함으로써 앞으로 당뇨 합병증의 예방 및 치료에 관련된 물질개발 연구에 기초연구 자료로서 기여코자 하였다. 따라서 흰쥐를 대상으로 비타민 E 수준을 달리한 식이로 일정기간 사육한 후 당뇨를 유발시켜 신장조직에서의 항산화계에 미치는 vitamin E의 영향을 규명하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육

실험동물은 체중 100g 내외의 Sprague-Dawley종 숫컷을 대전화학연구소에서 구입하여 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반 배합사료로 일주일간 예비사육한 후, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 Table 1과 같이 비타민 E를 40mg/kg diet를 첨가한 식이를 공급하면서 당뇨를 유발시키지 않은 정상군(Normal)과 당뇨유발 실험군으로 나누었다. 실험군은 식이내 비타민 E의 급여 수준에 따라 비타민 E를 급여하지 않은 군(DM-0E), 비타민 E를 40mg/kg diet(DM-40E) 공급한 군, 비타민 E를 다량 급여한 군 즉, 400mg/kg diet(DM-400E) 등 각 10마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 기본 실험 식이조성은 Table 2와 같다. 체중은 실험기간 동안 매일 측정하고 체중증가율 및 식이효율을 계산하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 10^\circ\text{C}$ 였고, 습도는 $50 \pm 10\%$ 였다. 선행연구(10)에서 당뇨유발 후 기간별로 관찰했을 때 STZ유발 6일 이면 연구목적을 충분히 관찰할 수 있었으므로 본 실험에서도 STZ 투여 후 6일째 실험동물을 회생하여 실험하였다.

Table 1. Classification of experimental groups

Groups ¹⁾	Vitamin E ²⁾ (mg/kg diet)	Streptozotocin ³⁾ (55mg/kg B.W.)
Nomal-40E	40	—
DM-0E	0	+
DM-40E	40	+
DM-400E	400	+

¹⁾Normal-40E group: No streptozotocin injection after vitamin E 40mg/kg diet supplementation

DM-0E group: Streptozotocin injection after vitamin E free diet

DM-40E group: Streptozotocin injection after vitamin E 40mg/kg diet supplementation

DM-400E group: Streptozotocin injection after vitamin E 400mg/kg diet supplementation

²⁾Vitamin E: dl- α -tocopherylacetate

³⁾Intravenous injection of streptozotocin(55mg/kg B.W.) in citrate buffer(pH 4.3) via tail vein.

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredients	Amount(g/kg diet)
Corn starch	668
Casein ¹⁾	180
DL-methionine ²⁾	2
Corn oil	50
Salt mixture ³⁾	40
Vitamin mixture ⁴⁾	10
Cellulose ⁵⁾	50
kcal/kg	3850

¹⁾Lactic Casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wellington, N. Z.

²⁾Sigma Chem. Co.

³⁾Salt mixture, AIN-76(g/kg): calcium phosphate(CaHPO₄) 500, NaCl 74, potassium citrate 220, potassium sulfate (K₂SO₄) 52, magnesium oxide(MgO) 24, manganous carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate(KIO₃) 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose 118.03

⁴⁾Vitamin E mixture(V-E free): contained thiamin · HCl, 0.6g; riboflavin, 0.6g; pyridoxin HCl, 0.7g; nicotinic acid, 3.0g; Ca-pantothenate, 1.6g; folic acid, 0.2g; biotin, 0.02g; vitamin B₁₂, 0.001g; retinyl acetate, 4.0×10⁵units; ergocalciferol, 1.6×10 units; menadione, 0.075g; glucose, 992.5g

⁵⁾Sigma Chem. Co.: CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

당뇨 유발

실험동물을 일주일의 예비사육과 식이내 비타민 E의 농도에 따른 식이를 4주간 공급한 후 실험동물에 streptozotocin(STZ), 55mg/kg B.W.을 신선한 0.1M sodium citrate buffer(pH 4.3)에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사하여 당뇨를 유발시켰으며 STZ 주사 후 6일째에 혈당농도가 300mg/dl 이상인 동물만 희생하여 본 실험에 사용하였다.

식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

식이와 식수 섭취량 및 체중은 전 실험 기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 전 체중증가량을 같은 기간 동안의 식이섭취량으로 나누어줌으로써 계산하였다.

혈당, 혈장 인슐린 함량 측정

실험 종료 후 동물을 가벼운 ether 마취하에서 22 gauge의 주사기로 복부 대동맥으로부터 혈액을 채혈하여 heparin 처리한 혈액 일정량과 heparin 처리하지 않은 혈액을 각각 따로 취하여 실온에서 30분간 방치한 후 1500×g에서 각각 15분간 원심분리하여 혈청과 혈장을 얻었다. 혈청은 혈당 측정용으로, 혈장은 인슐린

측정용으로 각각 사용하였다.

혈당 측정은 아산제약의 enzymatic kit AM 201K를 사용하여 500nm에서 비색 정량하였다. 혈장 인슐린은 radioimmunoassay법(11)에 따라 인슐린 RIA BEAD II kit(Abbott)를 사용하여 측정하였다.

신장조직중의 항산화계 활성 측정

분석 시료의 전 처리

채취한 신장조직을 0.9% NaCl로 세척한 후 액체질소로 급속냉동시킨 후 -80°C에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다. 신장조직을 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose/0.5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)/5mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES)용액으로서 10%(w/v) 마쇄액을 만들어서 Park의 방법(12)에 따라 전처리하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund and Marklund(13)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 tris-HCl buffer(50mM Tris/10mM EDTA, pH 8.5) 1.5ml에 효소용액 0.1ml를 넣고 7.2mM pyrogallol 0.1ml를 가함으로서 반응을 시작시킨 다음 25°C에서 정확히 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.05ml를 가해 반응을 정지시켜 산화된 pyrogallol의 흡광도를 420nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

Glutathione peroxidase(GSHpx) 활성 측정

GSHpx 활성은 Lawerence와 Burk의 방법(14)에 따라 측정하였다. 즉 1mM의 EDTA를 함유하는 pH 7.0의 0.1M potassium phosphate buffer 1.72ml에 효소용액 0.05ml와 0.2mM NADPH 0.3ml, glutathione reductase 100 unit, 1mM sodium azide 0.3ml 및 1mM 환원형 glutathione(GSH) 용액 0.3ml를 넣고 0.25mM H₂O₂ 용액 0.3ml를 가함으로서 반응을 시작시켜 340nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위를 1분간 1μmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

비타민 E 함량 측정

신장조직 마쇄액 1.0ml를 Kayden 등(15)의 방법에 따라 2% pyrogallol 5ml를 서서히 가열하면서 섞은 후 70°C의 항온수조에서 2분간 가온한 후 포화 KOH 용액

0.3ml를 가하여 완전히 섞은 후 다시 70°C의 수온조에서 30분간 가온하였다. 이것을 얼음 속에서 냉각시켜 중류수 4ml와 hexane 10ml를 가한 후 2분간 세게 훤팔어 1,500×g에서 10분간 원심 분리한 상층액(hexane layer) 7ml를 갈색 시험관에 취하여 30°C에서 질소가 스스로 건조시켰다. 이것을 시료로 하여 ferric chloride dipyridyl법(16)에 의해 직사광선을 피한 상태에서 0.5% ferric chloride 0.8ml와 0.5% dipyridyl 0.8ml를 가하여 세게 훤팔어 잘 섞은 후 무수 ethanol 2ml를 가하고 ferric chloride 시약을 넣은 후 10분 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 함량 측정

간장조직 microsome의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry방법(17)에 의해 측정하였다.

신장조직중의 superoxide radical(O_2^-) 측정

시료의 전처리

신장조직의 mitochondria 분획은 Haper의 변형된 방법(18)에 따라 완충용액(1.15% KCl/10mM phosphate buffer/5mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 균질화한 다음 700×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 9,000×g에서 15분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 분리한다. 이때 생긴 pellet 층에 완충용액을 2ml 부유시킨 후 1ml씩 나누어서 -80°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

Superoxide radical 생성량 관찰

Superoxide radical 함량 측정은 Azzi 등(19)의 방법에 준해 50mM K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 90mM succinate, 150mM KCl, 30mM KCN, 0.3mM cytochrome c 및 mitochondria 효소원을 첨가하여 최종 반응액이 3.0ml가 되게 하였다. 이 반응액을 37°C에서 2분간 반응시키면서 550nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 superoxide radical의 함량을 산정하였다. Superoxide radical 함량은 1mg의 단백질이 1분간 생성시킨 reduced cytochrome c의 양을 nmole로 나타내었다.

통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는지를 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA 검증)을 수행하였으며, 분산분석의 결과 유의성이 발견된 경우 식이군간의 유의도는 Tukey's-HSD test(20)

에 의해 분석하였다. 각 지표간의 상관관계는 SPSS package program을 이용하여 correlation coefficient를 구하여 분석하였다.

결과 및 고찰

체중증가, 식이섭취량, 식이효율 및 신장의 무게

비타민 E 수준을 달리한 식이로 사육한 당뇨유발 이전의 4주간과 당뇨유발 후 6일 동안의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Fig. 1 및 Table 3과 같다. 체중증가, 식이섭취량 및 식이효율은 당뇨유발 전에는 식이군간에 유의적인 차이가 없었다. 당뇨유발 후 체중증가량과 식이효율은 당뇨군이 정상군에 비해 감소되었으며 식이섭취량은 증가되었으나 비타민 E의 효과는 없었다. 신장의 무게는 Table 4와 같이 정상군에 비해 당뇨군에서 증가되었으며 당뇨군간에는 식이 비타민 E 수준 차이에 의한 변화는 없었다.

혈청 insulin 농도 및 혈당량

당뇨 유발과 그 정도를 관찰하기 위하여 회생하기 전 6시간 절식시킨 후 혈장 insulin 농도 및 혈당을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 혈장 insulin은 정상군에 비해 DM-OE, DM-40E 및 DM-400E 군에서 각각 27%, 22% 및 25%씩 각각 감소하였으며, 당뇨 유발군 사이에는 유의적 차이가 없었다. 혈당수준은 정상군에 비해 DM-OE, DM-40E 및 DM-400E군이 227%, 195% 및 190%씩 각각 유의적으로 높았으며 당뇨군간에는 유의적 차이가 없었다. 이와같이 혈장 insulin 농도가 낮을수록 혈당 수준이 높아지는 상관관계를 나타났으며 비타

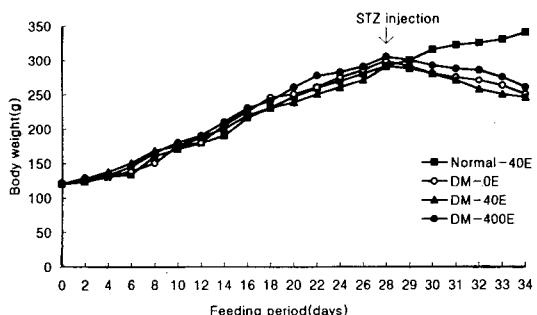


Fig. 1. Changes of body weights of experimental rats during feeding periods.

Experimental conditions were same as given in Table 1.

Normal and diabetic groups were injected with saline and 55mg STZ/100g b.w. via tail vein, respectively.

Table 3. Effects of vitamin E on changes in body weight gains, food intakes and food efficiency ratios(FER)

Group	Body weight gain (g)	Food intake (g)	FER
During 4 wks before STZ injection			
Normal-40E	168.57±7.00 ^{1)NS2)}	576.91±19.60 ^{NS}	0.28±0.01 ^{NS}
DM-0E	157.00±0.40	624.33± 4.00	0.31±0.07
DM-40E	164.50±7.80	564.00± 9.20	0.37±0.11
DM-400E	163.38±1.40	602.51±18.40	0.32±0.08
During 6 days after STZ injection			
Normal-40E	24.64±13.00 ^{a3)}	104.01± 6.50 ^a	0.23±0.04 ^a
DM-0E	-63.67±15.40 ^b	120.78± 7.90 ^b	-1.63±0.09 ^b
DM-40E	-67.11±19.10 ^b	169.04±13.20 ^b	-0.82±0.15 ^b
DM-400E	-62.08±25.00 ^b	113.96± 9.70 ^b	-0.97±0.30 ^b

¹⁾All values are mean±SE(n=10).²⁾NS: Not significant.³⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's-HSD test.

민 E의 영향은 다소 있었으나 유의적인 수준은 아니었다.

신장조직중의 항산화계 관련지표

Superoxide dismutase(SOD)

생체내의 항산화 방어기구중 효소적 방어계의 하나로서 superoxide radical를 환원시켜 H₂O₂로 전환시키므로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 SOD의 활성은 Table 6과 같다. 정상군에 비해 DM-0E군과 DM-

40E군에서 33%, 27%씩 각각 유의적으로 낮았지만 비타민 E를 투여한 DM-400E군에서는 DM-0E군에 비해 35% 증가하였고 DM-40E군에 비해 24% 유의적으로 증가하여 정상군 수준으로 회복되었다.

Glutathione peroxidase(GSHpx)

Selenium을 함유하는 항산화 효소로 비타민 E와 함께 과산화물을 제거하므로써 세포막의 손상을 막지하는 GSHpx의 활성을 관찰한 결과는 Table 6과 같다. 정상군에 비해 DM-0E군은 20% 감소하였으며 DM-40E군은 정상군과 비슷한 수준이었다. 그러나 DM-400E군에서는 정상군 보다 29% 증가하여 식이 비타민 E의 공급 수준에 따라 GSHpx 활성도가 증가되는 경향을 보였다.

비타민 E 함량

생체내에서 산화적 손상으로부터 생체를 보호하는 방어기구 중 비효소적 방어계로 알려진 생리적 항산화

Table 4. Effects of vitamin E supplement on changes in kidney weights of STZ-induced diabetic rats

Group	Kidney	
	(g)	(g/100g bw)
Normal-40E	2.255±0.067 ^{1)a2)}	0.702±0.025 ^a
DM-0E	2.736±0.083 ^b	1.036±0.037 ^b
DM-40E	2.767±0.101 ^b	1.039±0.038 ^b
DM-400E	2.604±0.089 ^b	0.951±0.035 ^b

¹⁾All values are mean±SE(n=10).²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's-HSD test.**Table 5. Effects of vitamin E supplement on plasma insulin and blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats**

Group	Plasma insulin	Blood glucose
	(μU/ml)	(mg/dl)
Normal-40E	21.30±0.82 ^{1)a2)}	153.72± 4.13 ^a
DM-0E	15.60±0.60 ^b	502.37±39.47 ^b
DM-40E	16.58±0.62 ^b	453.08±11.25 ^b
DM-400E	15.90±1.20 ^b	445.91±51.32 ^b

¹⁾All values are mean±SE(n=10).²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's-HSD test.**Table 6. Effects of vitamin E supplement on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity of kidney in STZ-induced diabetic rats**

Group	SOD	GSHpx
	(unit/mg protein)	(nmol NADPH/mg protein/min)
Normal-40E	2.578±0.192 ^{1)a2)}	69.84±6.88 ^a
DM-0E	1.728±0.197 ^b	55.92±2.38 ^b
DM-40E	1.877±0.124 ^{bc}	75.42±5.64 ^a
DM-400E	2.331±0.076 ^{ac}	90.01±5.89 ^c

¹⁾All values are mean±SE(n=10).²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's-HSD test.

물질인 비타민 E 함량을 측정한 결과는 Table 7과 같다. 신장조직 중의 비타민 E 함량은 정상군에 비해 DM-0E군은 59%, DM-40E군은 49% 감소되었으며 DM-400E군은 정상군과 차이가 없었다. 따라서 신장조직의 비타민 E 함량은 식이 비타민 E 급여 수준에 의존하는 것으로 나타났다.

신장조직중의 superoxide radical 함량

신장조직중의 superoxide radical(O_2^-) 함량은 Fig. 2에서와 같이 정상군에 비해 당뇨 유발군에서 O_2^- 생성이 증가한 것으로 나타났으며 특히 비타민 E를 보충하지 않은 DM-0E군에서 이러한 현상이 더욱 가속화되어 정상군에 비해 150%의 O_2^- 증가되었고 DM-40E군과 DM-400E군에서 98%, 30%씩 각각 증가되었다. 또 DM-40E군과 DM-400E군은 DM-0E군에 비해 21%, 48%씩 각각 감소하였고, 비타민 E 급여 수준이 높은 DM-400E군의 O_2^- 생성 수준은 정상군과 유사하였다.

주요 parameter들 간의 상관관계

Superoxide radical과 주요 parameter들간의 상호

Table 7. Effects of vitamin E supplement on kidney vitamin E contents in STZ-induced diabetic rats

Group	Vitamin E ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$)
Normal-40E	$0.320 \pm 0.028^{\text{a}2)}$
DM-0E	$0.132 \pm 0.036^{\text{b}}$
DM-40E	$0.163 \pm 0.034^{\text{b}}$
DM-400E	$0.283 \pm 0.029^{\text{a}}$

¹⁾All values are mean \pm SE(n=10).

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's-HSD test.

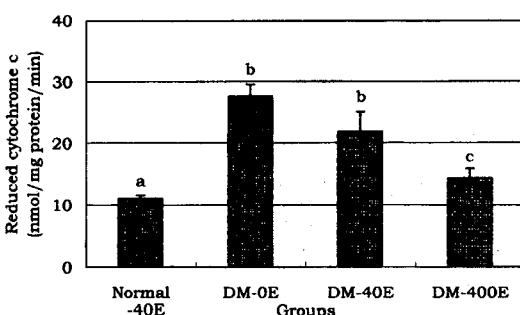


Fig. 2. Effects of vitamin E supplement on superoxide radical content in kidney of STZ-induced diabetic rats Mean \pm SE.

Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's-HSD test. Experimental conditions were same as given in Table 1.

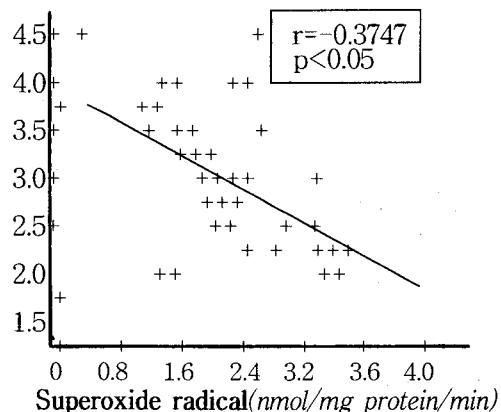
관련성은 Fig. 3과 같다.

Superoxide radical과 SOD($r=-0.3747$, $p<0.05$), GSH-px($r=-0.4171$, $p<0.05$) 활성과 부의 상관관계를 보였다.

본 연구는 신장조직에서의 항산화방어계와 활성산소종을 관찰하므로서 비타민 E의 당뇨 신장조직에서의 항산화 기능을 규명하는데 목적이 있다.

본 실험에서 체중증가량을 관찰한 결과 정상군은 계속적인 증가를 보인 반면 STZ 유발 당뇨군들은 현저하게 체중감소를 보였는데 이는 많은 다른 당뇨병 실험(21-24)에서 보고된 것과 같은 결과였다. 식이섭취량은 당뇨 유발 이전에는 비타민 E 공급 수준에 따른 식이군 간에 차이가 없었으나 당뇨 유발 후에는 당뇨군에서 유의적으로 증가하였다. 식이효율은 STZ 투여전에는 정상군과 실험군들간에 차이가 없었으나 STZ 투여 후 정상군에 비해 당뇨실험군 모두에서 현저히 감소하였

SOD(unit/mg protein)



GSHpx(nmol NADPH/mg protein)

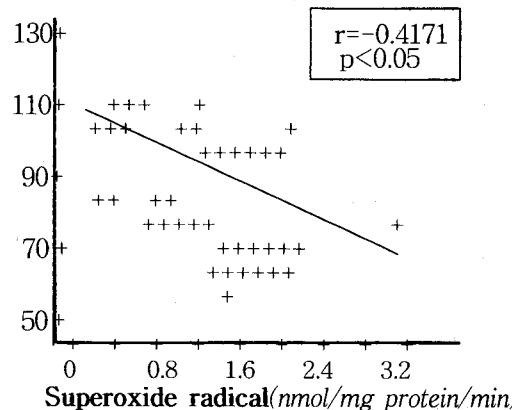


Fig. 3. Correlation coefficients between superoxide radical and SOD and GSHpx.

으며 식이군간에는 차이가 없었다. 이는 STZ 유발 당뇨군에서 식이섭취량이 증가한다는 Lau와 Failla(25)이나 Yung(9)의 연구에서와 일치했다.

신장의 무게는 대조군에 비해 당뇨군 모두가 증가되었으며 비타민 E의 영향은 없었고 체중 100g당 무게도 같은 경향이었다. 이와같이 당뇨병 초기에 급속한 신장비대가 있었던 것은 Seyer-Hansen(26)과 Flyvbjerg(27) 등의 결과들과 일치한다. 또 Hong(28)의 연구에서 이러한 당뇨병 초기의 신비대 현상은 신장조직내의 somatomedin-C의 분비효과와 관계가 있는 것으로 나타났으며 이러한 변화는 인슐린 투여로 일부 억제됨을 관찰하였다. 혈청 중의 insulin의 농도를 관찰한 결과 당뇨 유발군에서는 현저하게 감소되었고 실험군 사이에서는 유의적 차이가 없었으며 반대로 혈당치는 정상군에 비해 당뇨군이 증가하였으며 실험군간의 차이는 없었다. 이는 STZ에 의해 유발된 당뇨쥐에서 비타민 E는 insulin 함량과 혈당량에 영향을 미치지 않았다는 다른 연구보고(29,30)와 일치하였다.

당뇨합병증 중에서 혈관성 합병증은 대혈관성 질환과 미세혈관성 질환으로 대별된다. 그 중 미세혈관 합병증으로는 눈의 망막증이나 신경 및 신증을 들 수 있다. 특히 당뇨병성 신증은 인슐린의 존성 당뇨병에서는 40~50%, 인슐린 비의존성 당뇨병에서는 약 10~37%에서 발생하는 중요한 미세혈관성 합병증이다(31,32). 초기변화는 신사구체의 비대, 신사구체 기저막의 비후, 메산지움의 증식을 특징으로 하며(30) 이러한 신증의 유발은 신조직에서 혈관의 밀도가 높아 산화적 스트레스에 의한 혈관 손상과 혈관 기능장애와 관련성이 깊다고 볼 수 있다.

산화적 스트레스에 의한 혈관을 비롯한 여러 조직의 손상은 독성이 강한 자유 라디칼에 의한 반응의 결과이다. 자유 라디칼은 1개 또는 2개 이상의 부대전자(不對電子)를 가지며 독립해서 하나의 화학종으로서 존재할 수 있는 것을 가리킨다. Superoxide radical(O_2^-), hydroxyl radical(OH⁻) 및 singlet oxygen(1O_2) 등과 같은 자유 라디칼은 세포에 상해를 주며 특히 세포막의 다불포화지방산에 작용하여 지질과산화물을 생성하고 이로인해 세포의 기능을 손상시키므로써(33) 조직의 노화와 여러 질병의 발병과 관련이 있다.

정상적인 생리상태에서는 자유 라디칼의 생성계와 제거계인 항산화방어계(antioxidant defense system) 사이가 균형을 이루고 있다. 그러나 내인적 혹은 외인적 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 자유 라디칼이 과다 생산되거나 혹은 항산화계의 활성이 감소되어 문제가 된다. 특히 당뇨병과 관련하여 산소 자유 라디칼

은 만성합병증 발생에 관여하는 주요 기전 중의 하나이다(31,32).

이러한 자유 라디칼의 제거계인 SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2 로 바꾸어 주며, 또 여기서 생성된 H_2O_2 는 다시 GSHpx와 catalase의 작용에 의해 H_2O 로 배설됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호한다. 본 연구에서 SOD 활성은 대조군에 비해 비타민 E 비투여군인 DM-0E군과 DM-40E군에서 유의적으로 낮아졌고 DM-400E군에서는 정상군 수준으로 회복되었다.

또 GSHpx활성은 생체내에서 대조군에 비해 DM-0E군에서 유의적으로 감소하였고 DM-40E군은 정상군과 비슷한 수준이었으며 또한 DM-400E군에서는 정상군보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 남중독으로 GSHpx 활성이 감소되었으나 식이내 비타민 E를 충분히 첨가한 경우 대조군에 비해 실험군의 GSHpx 활성이 증가하였다는 보고(9,34)나 당뇨쥐 간조직에서 그 활성이 감소되었다는 보고(9)와 일치하였다. 이러한 당뇨 유발군에서의 GSHpx 활성 저하는 STZ 투여로 인한 조직의 과산화적 손상에 기인하며, 비타민 E 첨가시는 이들 효소 활성이 필수적인 세포막 소기관들을 과산화로부터 보호하여 최적조건으로 유지하는데 기여하기 때문인 것으로 생각된다.

또한 생체내에서 산화적 손상으로부터 보호하는 비효소적 방어기구로 알려진 생리적 항산화 물질인 신장조직중의 비타민 E 함량은 정상군에 비해 DM-0E 및 DM-40E군은 각각 50%, 36%씩 감소되었다. 그러나 DM-400E군은 정상군보다 다소 낮았지만 유의적인 차이는 없었다. Cho와 Choi(34)의 최근 연구에 의하면 비타민 E의 양을 변화시켰을 때 체내 비타민 E의 영양상태 뿐만 아니라 glutathione과 같은 항산화 물질이 조직의 항산화 이용에 소모되므로 그 수준이 변했다고 보고하였으며, 또 신장 병변의 변화는 정상군에서는 고비타민 E 식이(206mg/kg diet) 효과가 관찰되지 않았으나 당뇨군에서는 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 사구체 기저막 비후 및 석회화가 감소되었다고 하였다.

또한 본 실험에서 자유 라디칼중 대표적인 superoxide radical(O_2^-) 생성을 측정한 결과 대조군에 비해 당뇨 유발군에서 증가한 것으로 나타났으며, 이것은 당뇨병 상태의 경우 활성산소 생성이 현저하게 증가한다는 보고(35)와 일치하였다. 특히 이러한 현상은 비타민 E를 공급하지 않은 군에서 더욱 가속화되었다.

이상의 당뇨 유발 흰쥐의 신장조직에서의 식이 비타민 E의 항산화 기능작용을 종합해보면 식이 비타민 E는 생체내 항산화방어기구인 SOD와 GSHpx 활성과 비

타민 E 함량을 증가시켜 산화적 스트레스로 인해 생성된 superoxide radical 생성을 현저하게 감소시켰다.

요 약

본 연구는 당뇨쥐에 있어서의 비타민 E의 신장조직에 대한 항산화 기능에 미치는 영향을 규명하기 위해 수행되었다. 실험동물은 $100 \pm 10\text{g}$ 내외의 Sprague-Dawley 종 수컷을 vit E 40mg/kg diet를 공급한 정상군과 당뇨군으로 나눈 후 당뇨군은 다시 식이내 비타민 E의 함량에 따라 0mg vitamin E/kg diet(DM-0E군), 40mg vitamin E/kg diet(DM-40E군), 400 mg vitamin E/kg diet(DM-400E군)으로 달리하여 4주간 사육한 후 streptozotocin(STZ)으로 당뇨를 유발한 후 6일째에 희생시켰다. 체중증가, 식이섭취, 식이효율은 당뇨유발 전에는 식이군간에 유의적인 변화가 없었으나 STZ 투여 후 체중증가량과 식이효율은 당뇨 유발군들은 현저하게 체중이 감소되었고 식이섭취량은 증가되었으며 이들 변화에 비타민 E의 영향은 없었다. 신장의 무게는 정상군에 비해 당뇨군에서 유의적으로 증가되었고 당뇨 실험군간에 유의적 차이는 없었다. 혈장 인슐린은 정상군에 비해 DM군은 감소되었으며 혈당수준은 반대로 정상군에 비해 DM군이 증가되었으나 당뇨군간에 유의적 차이는 없었다. 신장조직 중의 항산화계를 관찰한 결과 SOD 활성은 정상군에 비해 DM-0E군, DM-40E군에서 33%, 27%씩 유의적으로 감소되었으나 DM-400E군은 정상군 수준으로 회복되었다. GSHpx 활성은 정상군에 비해 DM-0E군은 20% 감소되고 DM-40E군은 정상군과 비슷하였으며 DM-400E군은 정상군에 비해 29% 증가되었다. 신장조직의 비타민 E의 함량을 관찰한 결과 정상군에 비해 DM-0E군, DM-40E군에서 58%와 49%로 각각 감소되었으나 DM-400E군은 정상군 수준이었다. 신장조직 중의 superoxide radical(O_2^-) 생성량을 관찰한 결과 정상군에 비해 DM-0E군, DM-40E군에서 150%, 98%씩 각각 증가되었으나 DM-400E군은 정상군 수준이었다. 이상과 같이 STZ 유발 당뇨쥐 신장조직은 당뇨 유발로 인하여 항산화계 불균형이 발생하고 조직의 지질과 산화물과 활성산소종의 생성이 증가되었다. 그러나 식이내 비타민 E 다양 투여는 생체내 항산화방어기구인 SOD와 GSHpx 활성과 비타민 E 함량을 증가시켜 산화적 스트레스로 인해 생성된 superoxide radical 생성을 현저하게 감소시켰다. 결론적으로 비타민 E는 다른 조직에서와 같이 신장조직에서도 chain-breaking antioxidant 역할로서 항산화계를 강화시키는 기능이 규명되었다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 연구비(1997-002-D00327)의 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

문 현

- Huk, K. B. : The present status of nutrition-related diseases and its countermeasures. *Korean J. Nutrition*, **23**, 197-207(1990)
- Kannel, W. B. and McGee, D. L. : Diabetes and cardiovascular disease. *J.A.H.A.*, **241**, 2035-2038(1979)
- Garcia, M. J., McNamara, P. M., Gordon, T. and Kannel, W. B. : Morbidity in mortality in diabetes in the Framingham population. *Diabetes*, **23**, 103-107(1974)
- Patoa, R. C. and Passa, P. : Platelets and diabetic vascular disease, *Diabetes Metab.*, **9**, 302-309(1983)
- Baynes, J. W. : Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405-421(1991)
- Hammers, H. D., Martin, S., Fedeslin, K., Geisen, K. and Brownlee, M. : Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **88**, 11555-11558(1991)
- Krolewski, U., Fridorich, I., Grundy, S. M. and Williams, G. : Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 1251-1255(1995)
- Mccord, J. M. and Fridorich, I. : Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocytrein(hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055(1969)
- Yung, J. A. : Effects of green tea catechin on the antithrombus in streptozotocin-induced diabetic rats. The Graduate school, Catholic University of Taegu-Hyosung(1997)
- Rhee, S. J., Yang, J. A., Kim, S. O., Choe, J. H., Shin, J. Y., Choi, Y. M. and Cha, B. K. : Changes of physiological antioxidative system according to the period in streptozotocin-induced diabetic rats. *HSJAS*, **5**, 117-125(1997)
- Winifred, E. I., Josephine, F. and McKee, I. : Serum cortisol levels in severely stressed patients. *Lancet*, **19**, 1414-1415(1985)
- Park, M. H. : Effects of dietary selenium on peroxidative damage and antioxidative system in brain of cadmium administered rats. *Kor. J. Gerontol.*, **4**, 14-19(1994)
- Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem*, **47**, 469-474(1974)
- Lawrence, R. A. and Burk, R. F. : Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952-958(1976)
- Kayden, H. J., Chow, C. K. and Bjornson, L. K. : Spec-

- trophometric method for determination of α -tocopherol in red cell. *J. Lipid Res.*, **14**, 553-540(1973)
16. Hawk, P. B., Oser, B. L. and Summerson, W. H. : Ferric chloride dipyridyl method(Emmenrie-Engel reaction). 13th ed., Practical Physio Chem., JAL Churchill LTD, pp.1272-1279(1956)
 17. Lowry, O. H., Rosenbrouth, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
 18. Haper, M. J. K., Catherine, J., Norris, W. E. and Friedrichs, M. A. : Poly I : C accelerates ovum transport in the rabbit by a prostaglandin-mediated mechanism. *J. Reprod. Fert.*, **63**, 81-89(1981)
 19. Azzi, A., Montecucco, C. and Richter, C. : The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membrane. *Biochem. Biophys. Res.*, **65**, 597-603(1975)
 20. Chai, S. E. and Kim, B. R. : *Statistic analysis used spss/pc*. Bummun Co.(1988)
 21. Hoguchi, Y. : Lipid peroxides and α -tocopherol in rat STZ-induced diabetes mellitus. *Acta Med. Okayama*, **36**, 165-175(1982)
 22. Craft, N. E. and Failla, M. L. : Zinc, iron and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **244**, 122-128(1983)
 23. Failla, M. L. and Kiser, R. A. : Hepatic and renal metabolism of copper and zinc in the diabetic rat. *Am. J. Physiol.*, **244**, E115-121(1983)
 24. Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W. and Renols, A. E. : Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, **48**, 2129-2139(1969)
 25. Lau, A. L. and Failla, M. L. : Urinary excretion of zinc, copper and iron in the streptozotocin-diabetic rat. *J. Nutr.*, **114**, 224-233(1984)
 26. Seyer-Hansen, K. : Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **51**, 551-555 (1976)
 27. Flyvbjerg, A. T., Ussing, O., Naeraa, R., Arvallou, R. and Inberti, C. : Kidney tissue somatomedin-C and initial renal growth in diabetic rats. *Diabetologia*, **31**, 310-314 (1988)
 28. Hong, S. K. : SOMATO-MEDIN-C/IGF-I and rapidly renal swelling on kidney in diabetic rats. The Graduate school, Seoul National University(1989)
 29. Morel, D. W. and Chisolm, G. M. : Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J. Lipid Res.*, **30**, 1927-1834(1989)
 30. Karpen, C. W., Prichard, K. A., Arnold, J. H., Cornwell, D. G. and Panganamala, R. V. : Restoration of prostacyclin I₂/thromboxane A₂ balance in the diabetic rat Influence of dietary vitamin E. *Diabetes*, **31**, 947-951 (1982)
 31. Maureen, I. H. and Michaela, M. : Screening for NIDDM. *Diabetes Care*, **17**, 440-444(1994)
 32. Osterby, R. : Morphometric studies of the peripheral GBM in early juvenile diabetes 1 Development of initial GBM thickening. *Diabetologia*, **8**, 84-92(1972)
 33. Bruce, A. F., James, D. and Carpo, M. D. : Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412-426(1982)
 34. Cho, S. H. and Choi, Y. S. : Lipid peroxidation and antioxidant status affected by different vitamin E levels in fish oil feeding. *Lipids*, **3**, 47-52(1993)
 35. Wolff, S. P., Jiang, Z. Y. and Hunt, J. V. : Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 339-352(1991)

(1999년 3월 3일 접수)