

# 상백피 추출물이 당뇨병 마우스에 미치는 영향

林錫麟\*

## Abstract

### Antilipidperoxidative Effects of Morus alba in Diabetic Mice

Lim Seok-rhin

College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

Morus alba extract(MAE) was tested for its ability to inhibit alloxan induced lipidperoxidation. Lipid peroxide contents in serum, liver, kidney and heart were measured by the TBA method. ICR mice receiving alloxan at a dose of 60mg/kg intraperitoneally after a 24hrs starvation showed significantly increased lipid peroxide contents as compared to untreated control. Lipid peroxide contents in serum, liver, kidney of alloxan-diabetic mice were decreased by the treatment of MAE at the dose of 50mg/kg, 100mg/kg for 7 days.

## I. 서론

당뇨병은 혈중 인슐린이 절대적으로 부족하여 지속적인 고혈당을 나타내는 제 1형 당뇨병과 정상 또는 고인슐린 혈증을 나타내면서도 말초조직에서 당의 이용을 저하로 고혈당이 되는 제2형 당뇨병으로 구분된다. 이중 제 1형 당뇨병은 전체인구의 0.0031%-0.2%에 달하는 것으로 보고되고 있으며 환자수가 매년 증가하는 것으로 알려져 있다. 제 1형 당뇨병은 대부분 자가면역성질환이며, 화학물질에 의한 췌장세포의 파괴에 의해서도 유발된다(12). 당뇨병을 유발하는 화학물질에는 streptozotocin, alloxan, chlorozotocin, vacor, cyproheptadine등이 알려져 있다(1,9,13). 이들 화학물질에 의한 췌장의 beta cell의 파괴 기전은 oxygen free radical을 소거하는 endogenous scavenger system에 변화의 초래, DNA 절단으로

인한 ribosylation의 증가와 이에 수반한 NAD의 고갈, CaM이나 active transport에 의해 활성화되는 protein kinase의 억제 등을 통하여 나타난다(2). Alloxan은 체내에서 효소적 또는 비효소적으로 분해하여 free radical을 형성하여 세포막을 파괴함으로써 당뇨병을 유발하며, 다른 장기의 불포화지방산이 많이 포함된 막에도 작용하여 지질과산화물을 유발한다(3,11). 당뇨병 상태에서는 여러 가지 합병증이 유발되는데, 이 과정은 과산화지질이 매우 중요한 역할을 하고 있다. 유해산소로 알려져 있는 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항 산소( $^3O_2$ )가 환원되면서 superoxide anion radical, 과산화수소, hydroxy radical, lipidperoxide나 여기에서 생기는 free radical(ROO, RO)등의 과산화지질로서, 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때 free radical로 인한 oxidative stress가 생체내에 가해져 노화나 암 등의 여러 가지 성인병의 원인이 되고 있다(5-8). 또한 생체내에서는 다량의 산소가 여러 가지 활성산

\* 大田大學校 韓醫科大學

소의 생성기회를 제공하여 단백질, 효소, DNA 손상을 일으키고 세포의 생체막 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화지질이나 산화분해물이 DNA나 RNA 단백질막 조직에 작용하여 각종 질병을 유발한다고 알려져 있다(17). 따라서 당뇨병 상태에서 유발되는 여러 가지 합병증을 예방하기 위해서는 과산화지질의 생성을 억제하는 것이 매우 중요한 일이 될 것이다(10,19).

본 실험에서는 당뇨병 상태에서의 여러 가지 합병증을 억제하는 방안의 하나로, 지질과산화를 차단하기 위하여 alloxan으로 유도된 당뇨병 마우스에 상백피 추출물을 투여하여 과산화지질 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

본 실험에서 사용된 마우스는 대한실험동물센터에서 분양받아 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 삼양사의 마우스 및 랫드용을 공급하였고 물은 제한없이 공급하였다.

### 2. 방법

#### 1) 당뇨병 유도

ICR mice(male, 20g 내외)를 24시간 절식시킨 후 생리식염수에 alloxan을 녹여 60mg/kg 용량으로 복강내 주사하였다. Alloxan 투여 3일 후 혈당을 검사하여 혈당치가 400mg/dl 이상되는 mice를 실험에 사용하였다.

#### 2) 시료의 투여

실험동물을 정상대조군(N), 당뇨병대조군(C)과 당뇨병시료처리군(DT)으로 구분하여 7일간 상백피 추출물을 50mg/kg, 100mg/kg의 용량으로 투여하였고, 정상대조군 및 당뇨병대조군에는 시험군과 동량의 생리식염수를 투여하였다.

#### 3) 혈청 과산화지질 생성에 미치는 영향 측정

마지막 시료를 투여하고 24시간 후 채혈하여 10분간 3000rpm으로 원심분리한 다음 상층을 취

하여 실험에 사용하였다. 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4ml과 phosphotungstic acid를 가하고 10분간 방치하였다. 3000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 침전된 고형물에 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 phosphotungstic acid를 가하여 혼합한 다음 다시 3000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층을 버리고 침전물을 취했다. 여기에 증류수 4ml를 가하고 현탁시킨 후 0.7% TBA 시약 1ml를 넣고 95°C에서 1시간 가열시킨 후 냉각하고 BuOH로 추출한 다음 원심분리를 행하였다. BuOH층을 취하여 형광을 측정하였다(535nm, 553nm). 혈청중의 과산화지질량은 검량선을 작성하여 정량하였다.

#### 4) 조직에서의 과산화 지질 측정

약물을 투여하고 간, 신장, 심장을 신속히 적출하였다. 적출한 간에 0.05M phosphate buffer를 장기 무게의 5배를 가하고 homogenation한 다음 1 ml씩 취하였다. 여기에 7% sodium dodecyl sulfate(SDS)용액 1ml를 가하고 37°C에서 30분간 가온하였다. 여기에 1N HCl 2ml와 0.7% TBA 1ml를 가한 다음 95°C에서 1시간 가열하였다. 냉각 후 BuOH로 추출한 다음 3000rpm에서 15분간 원심분리 후 BuOH층을 취하여 흡광을(53nm) 측정하였다.

#### 5) 단백질 정량

단백질 정량은 표준품을 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법에 의하여 정량하였다(11).

#### 6) 통계처리

수치는 mean ± standard error로 표시하였다. 유의성 검정은 각 군에 대하여 student t-test로 검정하였다.

## III. 고 찰

Alloxan은 mesoxalyl urea, mesoxalyl carbamide, 2,4,5,6-tetraoxo hexahydropyrimidine, pyrimidine-tetrone이라고도 불리며, 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포를 선택적으로 파괴하여 인슐린 결핍성 당뇨병을 유발하는 화학물질로 알려져 있다. 이 물질은 체내에서 효소적 또는 비효소적으로 분

해하여 free radical을 형성하여 세포막을 파괴함으로써 당뇨병을 유발하며, 다른 장기의 불포화지방산이 많이 포함된 막에도 작용하여 지질과산화물을 유발한다(20). 지질과산화를 유발하는 물질에는 CCl<sub>4</sub>, EtOH, paraquat등 다수의 환경오염물질, 식품첨가물과 acetaminophen과 같은 약물들이 알려져 있다(8,9,15). 당뇨병 상태에서는 여러 가지 합병증이 유발되는데, 이 과정은 과산화지질이 매우 중요한 역할을 하고 있다. 본 실험에서는 당뇨병 상태에서의 지질과산화 억제물 알아보기 위하여 alloxan으로 당뇨병을 유도하고 상백피 추출물을 투여하였다.

혈장에서 과산화지질의 생성에 미치는 영향은 Table I에 나타내었다. 과산화지질 생성은 당뇨병 마우스의 혈장에서 정상군에 비하여 약 21%의 증가를 나타내었으며, 상백피 투여군에서는 과산화지질 생성이 감소하였다.

간에서의 지질과산화에 미치는 상백피의 영향은 Table II에 표시하였다. 간에서의 과산화지질의 생성은 여러가지 요인들이 작용하고 있는데, 유해산소로 알려져 있는 활성산소가 가장 안정한 형태인 삼중항 산소(<sup>3</sup>O<sub>2</sub>)가 환원되면서 superoxide anion radical, 과산화수소, hydroxy radical, lipidperoxide 나 여기에서 생기는 free radical(ROO, RO)등의 과산화지질등이 관련되어 있다(4,14). 따라서 free radical로 인한 oxidative stress를 효과적으로 억제할 수 있으면 과산화지질 생성을 억제할 수 있다. 결과에서 보듯이 정상대조군에 비하여 당뇨병군은 약 19%의 과산화지질 생성 증가를 보였다. 상백피 추출물을 50mg/kg, 100mg/kg을 7일간 투여했을 경우 과산화지질 생성이 억제되었는데, 이는 상백피중에 free radical scavenger가 포함되어 있을 가능성을 시사한다.

신장에서의 과산화지질 생성에 미치는 상백피의 영향은 Table III에 표시하였다. 당뇨병 마우스의 과산화지질 생성은 정상군에 비해 약 47%의 증가를 나타냈다. 이는 alloxan이 신장에서 acyl CoA synthetase 와 d-6-desaturase의 활성을 증가시키는 것과 관련이 있을 것으로 판단된다(17). 이 결과 신장에서의 불포화 지방산이 증가하며 지질의

과산화 확률도 높아진다. 상백피 추출물을 투여한 군은 당뇨병군에 비해 과산화지질 생성이 현저히 감소하였다.

당뇨병 마우스에서 과산화지질 생성은 신장에서 가장 컸으며, 간 및 혈장에서는 거의 같은 수준으로 증가시켰다. 이를 근거로 판단해 볼 때, 혈중의 과산화지질 함량은 주로 간의 손상과 관련이 많은 것으로 보인다.

본 실험에서 확인된 상백피의 과산화지질 생성 억제작용은 아직 정확한 기전을 알 수는 없다. 그러나 hydroxy free radical과 반응하여 작용을 억제시키는 scavenger로서 작용하는 물질을 다량 함유할 가능성이 있으며, superoxide dismutase나 glutathion peroxidase, catalase의 활성을 증가시키거나, 지질대사를 변화 시킴으로서 작용을 나타낼 수도 있을 것이다. 자세한 작용기전 및 작용물질을 밝히기 위해서는 더 연구를 진행해야 할 것이다.

Table I. Antilipidperoxidative Effect of MAE in Mice Serum

GROUP	MDA	% of
	(nmole/mg protein)	Normal
NORMAL	0.986 ± 0.105*	
DIABETIC MICE	1.173 ± 0.065	119
MAE(50mg/kg)	1.133 ± 0.034	115
MAE(100mg/kg)	1.014 ± 0.089*	104

All data are the mean ± SEM of 6 mice

\*= p < 0.05 vs normal group (by student's t-test)

Table II. Antilipidperoxidative Effect of MAE in Mice Liver

GROUP	MDA	% of
	(nmole/mg protein)	Normal
NORMAL	0.586 ± 0.024*	
DIABETIC MICE	0.709 ± 0.048	121
MAE(50mg/kg)	0.685 ± 0.072	117
MAE(100mg/kg)	0.615 ± 0.039*	105

All data are the mean ± SEM of 6 mice

\*= p < 0.05 vs normal group (by student's t-test)

Table III. Antilipidperoxidative Effects of MAE in Mice Kidney

GROUP	MDA (nmole/mg protein)	% of Normal
NORMAL	0.794 ± 0.067*	
DIABETIC MICE	1.167 ± 0.058	147
MAE(50mg/kg)	1.072 ± 0.039*	135
MAE(100mg/kg)	1.016 ± 0.073*	128

All data are the mean ± SEM of 6 mice

\*= p < 0.05 vs normal group(by student's t-test)

### 참 고 문 헌

- Kowalwski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., Vercesi, A.E., Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 271, 2929-34, 1996
- Riedl, A., Anderton, M., Shamsi, Z., Goldfarb, P., Wiseman, A., Structural modulation of lipidperoxidation by the proteins within membranes: model protein studies with liposomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 251S, 1995
- Schmitz, S., Thomas, P.D., Allen, T.M., Pozmansky, M.J., Jimbow, K., Dual role of melanins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation. *Photochem. Photobiol.*, 61, 650-5, 1995
- Tien, M., Morehouse, L.A., Bucher, J.R., Aust, S.D., The multiple effects of ethylenedia- minetetraacetate in several model lipid peroxidation systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 450-8, 1982
- Yang, M.X., Cederbaum, A.I., Role of cytochrome b5 in NADH-dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation, and hydrogen peroxide generation. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 282-92, 1995
- Wendel, A., Feuerstein, S., Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. pharmacol.* 30, 2513-20, 1981
- Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., Yagi, K., Serum lipidperoxide level in patients suffering from liver diseases. *Clin. Chim. Acta.* 79, 267-70, 1997
- Cederbaum, A. I., Becker, F.F., Rubin, E., Ethanol metabolism by a transplantable hepatocellular carcinoma. Role of microsomes and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251, 5366-74, 1976
- Azri, S., Mata, H.P., Gandolfi, A.J., Brendel, K., CCl4-induced cytochrome p-450 loss and lipid peroxidation in rat liver slices. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 283, 669-74, 1991
- Bevz, V.P., Panchisina, M.V., Age-related blood lipid levels in healthy persons and rheumatism patients. *Vopr. Revm.* 2, 59-61, 1981
- Peterson, G.L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356, 1997
- Morizikiewicz, A., Kielczewska-Morizikiewicz, D., Lowicki, Z., Chamara, E., Korzeniowska, K., Morizikiewicz, P.M., Blood levels of alloxan in children with insulin dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol.*, 31, 236-7, 1994
- Soto, C., Muriel, P., Reyes, J.L., Pancreatic lipid peroxidation in alloxan induced

- diabetes mellitus. Arch. Med. Res. 25, 377-80, 1994
14. Cederbaum, A.I., Organic hydroperoxide-dependent oxidation of ethanol by microsomes: lack of a role for free hydroxyl radicals. Arch. Biochem. Biophys. 227, 329-38, 1983
  15. Yamada, K., Fukushima, T., Mechanism of cytotoxicity of paraquat II. Organic specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria. Exp. Toxicol. Pathol., 45, 375-80, 1993
  16. Clark, D.L., Queener, S.F., Effect of diabetes mellitus on renal fatty acid activation and desaturation. Biochem. Pharmacol., 34, 4305-10, 1985
  17. Gelhorn, A., Benjamin, W., The effect of insulin on monounsaturated fatty acid synthesis in diabetic rats. The stability of the informational RNA and of the enzyme system concerned with fatty acid desaturation. Biochim. Biophys. Acta, 116, 460-6, 1966
  18. Noller, D.C., Chemistry of organic compounds, 3rd ed. (Philadelphia) p561, 1966
  19. Liebler, D.C., Burr, J.A., Antioxidant stoichiometry and the oxidative fate of vitamin E in peroxy radical scavenging reactions. Lipids 30, 789-93, 1995
  20. Woods, J.A., Knauer, T.E., Lamb, R.G., The acute effects of streptozotocin-induced diabetes on rat liver glycerolipid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 666, 482-92, 1981