

삼나무 에탄올 추출물이 Streptozotocin으로 유발한 흰쥐의 당뇨증상과 산화적 스트레스에 미치는 영향

신종욱¹ · 이상일² · 우미희³ · 김순동^{1*}

¹대구가톨릭대학교 의식식품산업학부 식품가공학전공, ²계명문화대학 식품영양조리과, ³대구가톨릭대학교 약학대학 약학과

Effect of Ethanol Extracts of Goat's Beard on Streptozotocin Induced Diabetic Symptoms and Oxidative Stress in Rats

Jong-Wook Shin¹, Sang-Il Lee², Mi-Hee Woo³ and Soon-Dong Kim^{1*}

¹Dept. of Food Industrial Technology, Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

²Dept. of Food Nutrition & Cookery, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea

³Dept. of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Abstract

The effects of goat's beard (*Aruncus dioicus* var *ramtschaticus* Hara) ethanol extracts (AD) on the streptozotocin-induced diabetic symptoms and oxidative stress in rats were assessed. Experimental plots were divided into normal controls (NC), diabetes controls (DM), diet with 0.3% AD after diabetes induction (SA), and diet with 0.6% AD after diabetes induction (SB), then fed for 5 weeks. In the SA and SB groups as compared with the DM group, diabetic symptoms including weight loss, increase in feed and water intake, and enlargement of the liver and kidney were improved. The levels of blood glucose and serum fructosamine were reduced by 17.9~27.2% and 25.6~32.6%, respectively. The activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and the levels of triglycerides, total cholesterol, and LDL-cholesterol in the serum were reduced by 25.6~30.3, 42.37~55.51, 26.85~30.44 and 37.29~39.11%, respectively, whereas the level of HDL-cholesterol was increased by 37.29~39.11%. Hepatic total (T) and O type (O) activities of xanthine oxidoreductase, O/T ratio(%) and level of lipid peroxide were significantly decreased, while the level of glutathione was increased, and also the activities of superoxide dismutase and glutathione S-transferase were increased by 56.84~94.90% and 57.14~68.92%, respectively. In the above results, it was noted that AD has an antidiabetic effect which alleviated hyperglycemia and the AD reduced and/or prevented the tissue damage caused by diabetes via the inhibition of reactive oxygen species (ROS) generating systems concurrent with an increase in ROS scavenging.

Key words : Goat beard, *Aruncus dioicus* var *ramtschaticus* Hara, antidiabetes, oxidative stress.

서론

경제발전에 따른 소득 향상과 이에 따른 육류 섭취량의 증가 그리고 교통, 통신수단의 발달로 인한 활동량 감소는 생활 습관병으로 알려져 있는 비만과 고지혈증, 동맥경화증, 고혈압 및 당뇨병 등과 같은 대사증후군의 발병율을 현저하게 증가시키고 있어 공중보건학적인 측면에서 체계적인 대책이 요구되고 있다. 특히 고지혈증은 인슐린 저항성을 유도하여 제 2형 당뇨병을 유발을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Bhattacharya et al 2007). 또한, 당뇨병은 지질대사의 이상을 초래하며 이로 인한 고지혈증 및 동맥경화증의 유발이 가능하여 고지혈증과 상호 밀접한 관련성을 가지는 것으로 보고되고 있

다(Dey et al 2005). 고혈당 상태에서는 포도당의 조직 내 산화가 감소되며 혈관 상피세포 내에서 대체 에너지인 지방산의 산화 증가로 인하여 ROS(reactive oxygen species)의 생성이 촉진되며 생성된 ROS에 의해 혈관조직의 손상을 초래(Ohkawa et al 1979)할 뿐만 아니라 insulin의 혈중 농도 감소에 따른 지질 대사의 이상을 유발시킴으로써 동맥경화의 위험성이 증가한다(Kannel & Mcgee 1979). 당뇨병은 최근 10년간에 크게 증가하여 우리나라 4대의 사망 원인(Annual report on the cause of death statistics 2002)중 하나로 알려지고 있으나, 현재까지 치유법이 확립되어 있지 않은 질환으로 지속적인 연구가 요망되고 있다.

한편, 삼나무는 울릉도에서 자생하며 눈개승마, 죽토자 및 goat's beard 등으로 불리어지는 장미과의 다년생 식물로 어린순이 20 cm 정도 자랐거나 복토 위로 짝이 보일 때 수확하

* Corresponding author : Soon-Dong Kim, Tel : +82-53-850-3216, Fax : +82-53-850-3216, E-mail : kimsd@cu.ac.kr

여 끓는 물로 데친 후 말리고 비늘형 껍질과 작은 잎을 제거한 후 식용으로 이용한다(Lee CB 2003). 울릉도에서는 삼나무이 해독 및 정력보강 효과가 있는 것으로 알려져 예로부터 명절에 쇠고기 국을 끓일 때 삼나무를 넣어서 이용하고 있다.

본 연구에서는 우리나라에서는 유일하게 울릉도에서만 자생하는 삼나무에 관한 심층적 연구를 통하여 식소재로서의 부가가치를 향상시키며 이용성을 향상시키기 위한 일련의 연구를 위한 예비 실험에서 현재까지 보이지 않았던 2~3개의 신물질들을 함유하는 삼나무 에탄올 추출물(미발효자료)에서 높은 항산화능을 나타내어 이 추출물이 streptozotocin으로 유발한 쥐의 당뇨증상과 산화적 스트레스에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

삼나무(*Aruncus dioicus* var. *ramtschaticus* Hara)은 2006년 이른 봄에 수확한 어린잎을 구입하여 동결건조한 후 100 mesh 입도로 분말화하여 사용하였다.

2. 에탄올 추출물의 제조

동결건조한 삼나무 5.0 kg에 80% ethanol 130 L를 가하여 상온에서 72시간 추출하였으며, 잔사는 다시 동일 방법으로 추출, Whatman No 2 여과지로 여과하여 얻은 여액을 40°C에서 감압농축하여 잔유물 2.2 kg을 얻었다. 이 잔유물을 AOAC 법 (1984)으로 분석한 일반 성분의 함량은 조단백질 17%, 탄수화물 50%, 지질 33%이었다.

3. 실험 동물과 실험식이의 조제

실험식이는 Shin *et al*(2008)의 방법에 따라 AIN-76 diet (Teklad, USA)를 기본으로 하여 조제하였다(Table 1). 실험 동물은 5주령의 평균 체중이 140±10 g인 Sprague-Dawley SPF/VAF outbred rats(Orient Ltd., Sungnamsi, Korea)를 사용하였으며, 1주일간 환경에 적응시킨 후 정상 대조군(NC), 당뇨대조군(DM), 당뇨 유발 후 삼나무 에탄올 추출물을 0.3% 첨가시킨 식이군(SA) 및 당뇨 유발 후 에탄올 추출물을 0.6% 첨가시킨 식이군(SB)의 4군(군당 7마리)으로 나누어 5주간 사육하였다. 삼나무의 섭취량은 사람의 경우 1일 섭취량을 200 g으로 가정하여 환산한 양(0.3%)과 그 2배량인 0.6% 양으로 설정하였다. 실험군 간의 칼로리를 조정하기 위하여 삼나무 추출물의 조단백, 탄수화물 및 지질 함량을 casein, sucrose 및 corn oil 함량에 적용하였다. 사육장은 stainless steel cage를 사용하고, 온도 및 습도는 23±2°C, 60±5%로 조정하였으며, 명암 주기는 12시간 간격으로 설정하고, 물과 사료의 섭취는 자유 섭취시켰다.

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	NC ³⁾	DM ⁴⁾	SA ⁵⁾	SB ⁶⁾
Casein	200	200	200	200
Corn starch	150	150	150	150
Sucrose	500	500	500	500
Cellulose	50	50	47	44
Corn oil	50	50	50	50
AIN mineral mixture ¹⁾	35	35	35	35
AIN vitamin mixture ²⁾	10	10	10	10
DL-methionine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2	2	2	2
Ethanol extract of goat's Beard	-	-	3	6
Total	1,000	1,000	1,000	1,000

¹⁾ AIN mineral mixture(g/kg): calcium lactate 620.0, sodium chloride 74.0, potassium phosphate di-basic 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 23.0, manganous carbonate 3.3, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.0, cupric carbonate 0.2, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.5, finely powdered to make 1,000 g.

²⁾ AIN vitamin mixture(mg/kg): thiamin-HCl 600, riboflavin±600, pyridoxine-HCl 700, nicotinic acid 3,000, D-calcium pantothenate 1,600, folic acid 200, D-biotin 20, vitamin B₁₂ 2.5, vitamin A 400,000 IU, vitamin D₃ 100,000 IU, vitamin E 7,500 IU, vitamin K 75, finely powdered to make 1,000 g.

³⁻⁶⁾ Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts.

4. 당뇨유발

Streptozotocin(STZ, Sigma Chem. Co., Mo, USA)을 0.1 M citrate buffer(pH 4.3)에 녹여 체중 250 g 이상인 실험 동물을 대상으로 55 mg/kg 농도로 대퇴부 근육에 주사하였다. STZ 투여 48시간 후 공복 시에 꼬리정맥으로부터 취한 혈액의 혈당농도가 300 mg/dL 이상인 동물을 실험에 이용하였다.

5. 체중, 식이섭취량 및 음용수 섭취량

체중, 식이 및 음용수 섭취량은 전 실험 기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 하루 동안의 증체량을 하루 동안의 식이섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

6. 혈당 및 혈청 Fructosamine 함량

혈당은 Gluco-Tester(Life Scan Inc., USA)로 매일 오전 10~

12시에 측정하였으며, 란셋을 이용하여 공복 시 꼬리부위 혈관으로부터 채혈하였다. 혈청 fructosamine 함량은 Johnson *et al*(1982)의 방법에 따라 ketoamine에 의해 nitrobluetetrazolium (NBT)이 환원되는 정도를 측정하였으며, 혈청 mL당 흡광도 (Δ O.D. 530 nm)으로 나타내었다.

7. 분석 시료의 채취

5주간 사육한 흰쥐는 물만을 주면서 12시간동안 절식시킨 후 에테르 마취 하에서 복부 대동맥으로부터 채혈한 다음, 병냉의 생리식염수로 간장을 관류하고 장기를 적출한 후 습기를 제거하고 무게를 측정하였다. 혈액은 실온에서 응고시킨 다음 4°C, 2,500×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C에 두면서 분석용 시료로 사용하였다.

8. 혈청지질 함량

혈청중성지질, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량은 kit 시약(AM 157S-K, AM 202-K, AM 203-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald *et al*(1972)의 방법에 따라 총 콜레스테롤 - HDL-콜레스테롤량 - (중성지질/5)의 계산식으로 구하였다.

9. 혈청 ALT 및 AST 활성

혈청 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 활성도는 Reitman & Freankel(1957)의 방법에 준하여 kit시약(Asan Pharm., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며 Karmen A(1955)의 방법에 따라 혈청 1 mL당 분당 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 Karmen unit로 나타내었다.

10. 간 조직의 GSH 및 LPO 함량

간 조직 glutathione(GSH)의 함량은 Ellman GL(1959)의 방법에 따라 간 조직 균질액에 2-nitrobenzoic acid를 가해 생성되는 thiophenol의 측정하였으며, 간 조직 g당 환원형 GSH μ mole로 나타내었다. Lipid peroxide(LPO)의 함량은 Satho K (1978)의 방법에 따라 간 조직 균질액에 thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 반응시킨 후 n-butanol을 가해 이행되는 TBA-reactive substance의 흡광도를 532 nm에서 측정, 분자흡광계수, $\epsilon=1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 함량을 산출하였으며 간 조직 g당 nmole로 나타내었다.

11. 간 조직의 XOR, SOD 및 GST 활성

효소원은 간 조직 일정량에 4배량의 병냉의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 균질화한 다음 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 나온 상정액을 사용하였다. Xanthine oxidoreduc-

tase(XOR)활성은 Stirpe & Della Corte(1969)의 방법에 따라 total type 활성은 NAD^+ 의 존재 하에서, O type 활성은 NAD^+ 를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였다. 활성도는 분당 단백질 1 mg이 기질인 xanthine으로부터 생성되는 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다. Superoxide dismutase(SOD) 활성은 Martin *et al*(1987)의 방법에 따라 효소원과 hematoxylin의 반응에서 생성되는 hematin을 560 nm에서 측정하였으며, 대조구의 흡광도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit로 하여 효소의 활성을 계산하였다. 활성도는 1 mg의 단백질이 hematoxylin의 자동산화를 억제하는 unit로 나타내었다. Glutathione S-transferase(GST)활성은 Habig *et al*(1974)의 방법에 따라 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 reduced glutathione 및 효소원의 반응에서 생성되는 thioether의 흡광도를 340 nm에서 측정, 흡광계수 $\epsilon=9.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 활성도를 계산하였으며, 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 thioether의 nmole로 나타내었다.

12. 단백질 함량 측정

간 조직의 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준용액으로 하여 Lowry *et al*(1951)법으로 측정하였다.

13. 통계처리

실험 결과는 실험 동물 7마리의 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 유의성 검증은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test를 행하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 증가량, 식이 및 음용수 섭취량, 식이효율

STZ에 의하여 당뇨가 유발되면 췌장 내 β -세포가 선택적으로 손상되면서 insulin 합성이 저하되고 당 대사의 불균형, 체지방의 과잉 분해 및 체단백의 지속적인 소실로 체중이 감소된다(Beppu *et al* 1987). 또한, 당뇨의 대표적인 현상으로 다식, 다음, 다뇨의 3다 현상이 나타난다(Park *et al* 2002). 본 연구에서 정상군(NC), 당뇨군(DM), 당뇨 유발 후 식이에 삼나무 에탄올 추출물을 0.3% 첨가한 식이군(SA)과 0.6% 첨가한 식이군(SB)으로 구분하여 5주간 사육한 후 체중 증가량, 식이섭취량, 음용수 섭취량 및 식이효율을 비교한 결과(Table 2), SA군과 SB군의 1일 체중 증가량은 NC군에는 미치지 못하는 못하였으나 DM군에 비하여는 유의적인 증가를 보였으며, 식이섭취량과 음용수 섭취량도 DM군에 비하여 감소하여 당뇨로 인한 다식과 다음 현상을 완화하였고 식이효율도 SB군에서는 DM군에 비하여 유의적으로 개선되었다. 삼나무 및 그 추출물의 항당뇨 효과에 대한 연구는 없으나, 항당뇨 효

Table 2. Effect of goat's beard ethanol extracts on the weight gain, amounts of feed and water intakes, and FER in STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks

Groups ¹⁾	Weight gain	Feed intakes (g/day /100g BW)	Water intakes (mL/day /100g BW)	FER ²⁾
NC	36.51±3.40 ^{a,3)}	6.93±0.19 ^c	20.07±2.59 ^c	1.35±0.08 ^a
DM	9.54±2.04 ^c	18.76±2.15 ^a	89.84±4.87 ^a	0.20±0.09 ^c
SA	18.21±3.30 ^b	16.80±1.75 ^{ab}	86.00±6.07 ^a	0.30±0.08 ^c
SB	14.43±3.17 ^b	13.47±1.76 ^b	66.30±5.81 ^b	0.47±0.07 ^b

¹⁾ Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts.

²⁾ Feed efficiency ratio; daily weight gain/daily feed intake.

³⁾ Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts within a column(a~c) indicate significant differences $p<0.05$.

과를 나타내는 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*) 추출물 및 꾸지뽕잎(*Cudrania tricuspidata*)에서도 본 연구에서와 같이 체중 감소를 완화하고 식이 및 음용수 섭취량을 감소시켰다는 보고가 있다(Shin *et al* 2005, Park *et al* 2008). 따라서 본 실험의 결과는 삼나물 에탄올 추출물이 당뇨로 인해 나타나는 체중 감소와 식이 섭취량 및 음용수 섭취량의 증가를 완화시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

2. 장기 중량

당뇨 유발 후 실험식으로 5주간 사육한 흰쥐의 체중에 대한 장기중량 %를 조사한 결과(Table 3), 당뇨유발군(DM, SA, SB)은 NC군에 비해 간장, 신장, 심장 및 비장의 중량이 유의적으로 증가하였으나, 실험식이군에서는 간장과 신장에서 DM

Table 3. Effect of goat's beard ethanol extracts on the organ weight percent per body weight in STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks (g/100 g body weight)

Groups ¹⁾	Liver	Kidney	Heart
NC	2.59±0.31 ^{c,2)}	0.58±0.05 ^c	0.30±0.01 ^b
DM	4.47±0.28 ^a	1.10±0.07 ^a	0.38±0.04 ^a
SA	4.16±0.29 ^{ab}	1.08±0.06 ^{ab}	0.37±0.03 ^a
SB	3.81±0.20 ^b	0.96±0.05 ^b	0.36±0.02 ^a

¹⁾ Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts.

²⁾ Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts within a column(a~c) indicate significant differences $p<0.05$.

군에 비하여 유의하게 감소하였다. STZ에 의해 당뇨가 유발되면 insulin의 분비가 감소되어 당대사의 불균형을 초래하게 되고 면역 기능이 저하되며, 간장, 신장, 심장 등의 장기 조직이 손상된다(Beppu *et al* 1987, Smith *et al* 1989). 또한, 과잉으로 생성되는 glucose flux와 비정상적인 RNA와 DNA의 합성은 장기 조직을 비대하게 한다(Sochor *et al* 1991). 따라서 당뇨와 장기 비대 현상과는 밀접한 관련이 있으며, 항당뇨 효과를 나타내는 홍삼, 가시오가피 등에서 장기 비대 현상이 감소하는 것으로 보고되고 있다(Shin *et al* 2002, Lee *et al* 2002). 본 실험의 결과에서도 삼나물 에탄올 추출물이 당뇨로 인한 장기의 중량을 감소시킴으로써 당뇨를 다소 완화시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

3. 혈당 및 Fructosamine 함량

당뇨 유발 후 실험식으로 5주간 사육하는 동안 혈당 변화를 조사한 결과(Fig. 1), NC군에서는 89.6~106.0 mg/dL 범위를 유지하였다. DM군에서는 당뇨유발 1주 후부터 전 실험 기간 동안 448.4~509.3 mg/dL의 고혈당을 유지하는데 비하여 삼나물 에탄올 추출물을 투여한 SA 및 SB군에서는 실험식이 2주째까지 증가하여 465.4~482.0 mg/dL를 나타내었으나, 3주째부터 낮아지기 시작하여 5주째는 DM군에 비하여 각각 27.2 및 17.9%가 감소하였다.

당뇨병에서는 glucose나 fructose와 같은 환원성 당류의 일부가 에너지대사 경로로 이행되지 못하고 단백질과 결합하여 advanced glycation end products(AGEs)로 명명되는 당화 단백질을 형성함으로써 2차적인 장기의 기능 손상을 야기한다(Smith *et al* 1989, Berrone *et al* 2006). 당뇨병에서 나타나는 고혈당의 조절 정도는 혈중 glycohemoglobin(HbA1c) 또는 혈청 fructosamine의 함량 변화를 관찰함으로써 판단할 수 있다(Koenig *et al* 1978). 그러나 혈중 HbA1c의 수준을 평가하는 것은 hemoglobin의 life cycle이 약 3개월 정도가 됨으로 6주이전의 혈당조절을 반영(Demetrious JA 1987)하는 반면 혈청 fructosamine은 2~3주의 혈당 조절 정도를 반영한다(Kaplan & Stein 1984). 그러므로 본 연구에서는 실험 기간이 5주인 점을 고려하여 혈청 fructosamine의 함량을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 혈청 mL당 fructosamine의 함량(O.D. at $\Delta 530$ nm)은 NC군에서는 0.22이었으나 DM군에서는 0.43로 증가하였으며, SA군과 SB군에서는 각각 0.29 및 0.32로 DM군에 비해 25.6~32.6%가 감소하였다.

4. 혈청 ALT 및 AST 활성

Fig. 2는 당뇨 유발 후 실험식으로 5주간 사육한 흰쥐에서 간 조직 손상의 지표로 알려진 혈청 ALT 및 AST 활성을 측정된 결과이다. ALT 활성은 DM군에서는 121.3 unit로 NC군

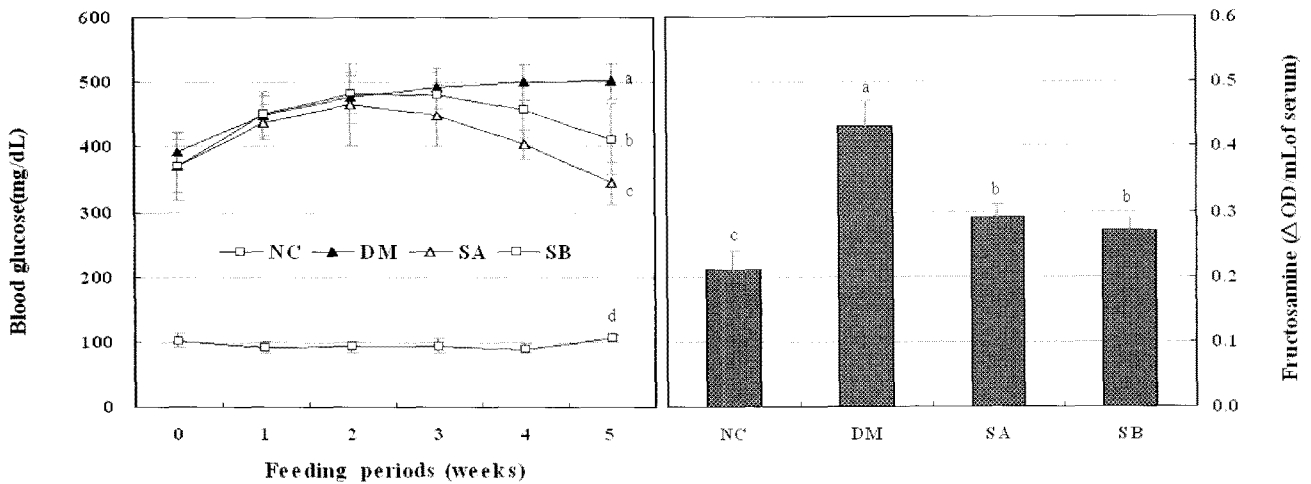


Fig. 1. Level of blood glucose and serum fructosamine in STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks. Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts. Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts in the figure indicate significant differences $p < 0.05$.

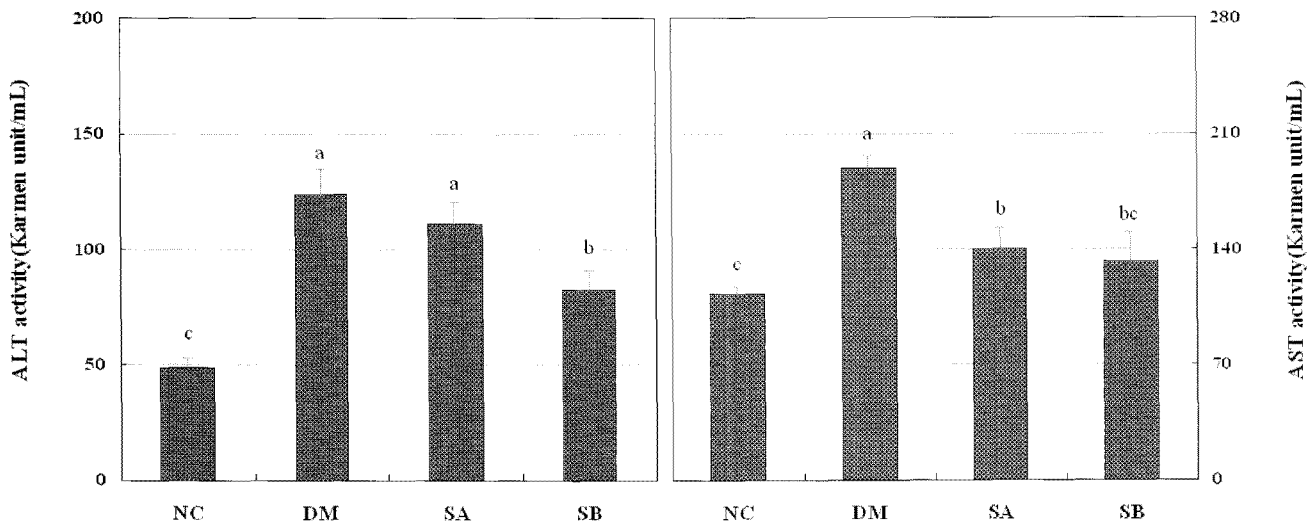


Fig. 2. Effect of goat's beard ethanol extracts on the ALT and AST activity in STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks. Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts. Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts in the figure indicate significant differences $p < 0.05$.

의 49.3 unit에 비해 약 2.7배 증가하였으나, SA군은 110.5 unit, SB군은 95.0 unit로 DM군에 비해 그 활성이 각각 8.9 및 21.7%가 감소하였다. 혈청 AST 활성은 DM군이 188.6 unit로 NC군의 112.7 unit에 비해 약 1.7배 증가하였으나, SA군과 SB군은 각각 140.3 및 131.5 unit로 DM군에 비해 각각 25.6 및 30.3%가 감소하였다.

ALT 및 AST는 생체내 아미노산을 생합성에 관여하는 효소로 특히, 간 조직에 많이 존재하며 약물이나 스트레스에 의하여 간조직이 손상 받게 되면 그 활성이 증가하게 되므로 간손상의 지표로 활용되고 있다(Reitman & Frankel 1957). 당뇨에서도 ALT 및 AST의 활성이 증가하며 항당뇨 효과를 나

타내는 소재들을 식이할 경우에는 이들의 활성이 감소하는 것으로 알려져 있는데, 고혈당 쥐에 *Grifola frondosa*을 함유하는 식이를 급여한 결과 혈당의 감소와 함께 이들 효소의 활성이 대조군에 비하여 18~36%가 감소하였다는 보고가 있다 (Lee *et al* 2007). 따라서 삼나무 에탄올 추출물은 당뇨에 의하여 손상된 간 조직을 회복시키는 효과가 있음을 나타낸다.

5. 혈청지질 함량 및 동맥경화지수

당뇨유발 후 실험식으로 5주간 사육한 흰쥐의 혈청 triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 함량을 조사한 결과는 Table 4와 같다. Triglyceride 함량은

DM군이 130.27 mg/dL로 NC군의 54.92 mg/dL에 비해 약 2.3배 증가하였으나, SA군 및 SB군은 75.07 mg/dL과 57.95 mg/dL로 DM군에 비해 각각 42.37%와 55.51%로 유의적으로 감소하였다. Total cholesterol 함량은 DM군이 129.47 mg/dL로 NC군의 83.02 mg/dL에 비해 유의적으로 증가하였으나, SA군은 94.71 mg/dL, SB군은 90.06 mg/dL로 DM군에 비해 각각 26.85 및 30.44%로 감소하였다. HDL-cholesterol 함량은 DM군이 NC군에 비하여 감소하는 경향이었으나, SA 및 SB군은 증가하는 경향을 보였다. 반면에 LDL-cholesterol 함량은 DM군이 73.90 mg/dL로 NC군의 36.51 mg/dL에 비해 유의적으로 증가하였으나, SA군 46.34 mg/dL, SB군 45.50 mg/dL로 DM군에 비해 각각 37.29 및 39.11%로 감소하였다. 동맥경화지수도 SA와 SB군에서 유의적으로 낮았다.

당뇨병에서는 고혈당으로 인하여 혈청지질의 대사에 이상을 초래하며, 혈청 내 VLDL (very low density lipoprotein)과 LDL(low density lipoprotein)의 함량이 증가하여 동맥경화성 관상동맥질환 또는 뇌혈관질환의 발생률이 높아진다(Lee *et al* 2003). 그러나 혈청지질 중 HDL(high density lipoprotein)은 LDL의 생성을 억제하거나 혈관에 축적된 cholesterol을 감소시킴으로써 동맥경화의 발생을 억제한다(Goren *et al* 1997). 이상의 실험 결과와 타 연구자들의 연구 결과를 고려할 때 삼나물 추출물은 당뇨로 인하여 발생하는 혈청지질의 변동을 개선함으로써 당뇨를 완화시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

6. XOR 활성

XOR은 hypoxanthine을 xanthine으로 산화시켜 uric acid를 생성할 뿐만 아니라 pyrimidine, aldehyde류 및 heterocyclic

화합물의 대사에도 관여하는 비특이적인 효소(Park *et al* 1997)로 정상적인 생리상태에서는 NAD⁺를 전자수용체로 이용하는 dehydrogenase type(D type)으로 존재하지만, 에탄올(Oei *et al* 1982), 사염화탄소(Ham & Kim 2004) 및 STZ(Urano *et al* 1991) 등의 투여로 간 조직이 손상될 경우에는 분자상의 O₂를 전자수용체로 이용하는 oxydase type(O type)으로 전환되어 superoxide 및 hydroxyl radical과 같은 ROS를 생성한다(Hashim *et al* 2005). 당뇨 유발 후 5주간 실험식으로 사육한 흰쥐 간 조직의 XOR 활성을 조사한 결과(Table 4), DM군에서는 total type의 활성이 1.24 nmole/mg으로 NC군의 0.97 nmole/mg에 비하여 유의적으로 증가하였으나, SA 및 SB군에서는 각각 1.03 및 0.95 nmole/mg으로 NC군의 수준으로 감소하였다. 반면에 O type의 활성은 NC군 0.27 nmole/mg,

Table 5. Effect of goat's beard ethanol extracts on the XOR activity in STZ induced diabetic rats fed for 5 weeks

Groups ¹⁾	XOR activity(uric acid nmole/mg protein/min)		
	Total type(T)	O type(O)	O/T(%)
NC	0.97±0.11 ^{b,2)}	0.27±0.07 ^c	27.82±3.28 ^c
DM	1.24±0.10 ^a	0.54±0.12 ^a	43.79±2.83 ^a
SA	1.23±0.13 ^a	0.43±0.06 ^{ab}	42.37±2.71 ^{ab}
SB	1.15±0.09 ^a	0.36±0.06 ^{bc}	37.41±2.43 ^b

¹⁾ Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts.

²⁾ Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts within a column(a~c) indicate significant differences $p < 0.05$.

Table 4. Effect of goat's beard ethanol extracts on the serum lipid in STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks

Groups ¹⁾	Experimental group ¹⁾			
	NC	DM	SA	SB
Triglyceride(mg/dL)	54.92±13.14 ^{b,4)}	130.27±19.28 ^a	75.07±23.48 ^b	57.95±14.31 ^b
Total cholesterol(mg/dL)	83.02±11.35 ^c	129.47± 8.96 ^a	94.71± 9.57 ^b	90.06± 7.86 ^{bc}
HDL-cholesterol(mg/dL)	35.52± 3.57 ^{NS,5)}	29.51± 3.16	33.35± 3.27	34.63± 3.74
LDL-cholesterol(mg/dL) ²⁾	36.51± 3.17 ^b	73.90± 3.98 ^a	46.34± 4.80 ^b	45.50± 3.28 ^b
Atherosclerotic index ³⁾	2.38± 0.27 ^b	4.48± 0.32 ^a	2.87± 0.39 ^b	2.50± 0.38 ^b

¹⁾ Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts.

²⁾ LDL-cholesterol = total cholesterol-HDL-cholesterol-(TG/5).

³⁾ Total cholesterol/HDL-cholesterol.

⁴⁾ Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts within a row(a~c) indicate significant differences $p < 0.05$.

⁵⁾ NS: Not significant.

DM군 0.54 nmole/mg, SA군 0.43 nmole/mg, SB군 0.36 nmole/mg으로 당뇨유발군중에서는 SB군이 가장 큰 감소를 보였으며, SA 및 SB군의 O/T 비율(%)도 DM군에 비하여 NC군이 27.82%이었으며, DM군은 43.79%로 NC군에 비해 유의적으로 증가하였으나, SA군과 SB군은 각각 42.37% 및 37.41%로 DM군에 비해 유의적으로 감소하였다. 따라서, 삼나무 에탄올 추출물에 의한 XOR의 total 및 O type의 활성이 억제됨으로써 나타난 결과로 생각되나, 이들 성분들에 의해 조직의 손상이 예방, 혹은 지연됨으로써 나타난 결과임을 배제할 수 없다.

7. GSH 및 LPO 함량

세포 내의 GSH는 산화적 스트레스에 대한 항산화 방어계의 기질로 이용되며(Kang *et al* 2004), LPO의 함량은 생체막의 손상 정도를 나타내는 지표로 알려져 있다(Ohkawa *et al* 1979). 또한, GSH의 함량이 감소하면 LPO 함량이 증가한다(Wang *et al* 2000). 당뇨유발 후 실험식으로 5주간 사육한 흰쥐의 간 조직의 GSH 함량은 NC군 3.27 μ mole/g, DM군 3.56 μ mole/g, SA군 3.77 μ mole/g, SB군 4.18 μ mole/g으로 실험식으로 인해 그 함량이 유의적으로 증가하였다. 한편, LPO 함량은 DM군에서는 12.48 nmole/g으로 NC군의 8.14 nmole/g에 비해 34.78%가 증가하였으나, SA 및 SB군에서는 각각 10.84 및 10.75 nmole/g으로 DM군에 비해 각각 13.14 및 13.86%가 감소하였다. 따라서 삼나무 에탄올 추출물 식이는 STZ로 유발한 당뇨쥐에서 간 조직의 GSH 함량을 유의적으로 증가시켰으며, 이와 동시에 XOR의 O type의 활성을 감소시킴

으로써 ROS의 생성량이 저하되고 LPO의 함량이 감소된 것으로 생각되며, 이러한 작용에 의해 당뇨에 의하여 손상된 간 조직을 회복시키는 것으로 사료된다.

8. SOD 및 GST 활성

Microsome의 cytochrome P₄₅₀ 및 mitochondria의 respiratory generating system에 의해 생성되는 ROS는 여러 종류의 질병 유발에 관여한다(Nohl & Jordan 1980). 이들 ROS는 SOD, glutathione peroxidase, GST 및 catalase와 같은 단백질 ROS 소거제(Habig *et al* 1974, Flohe *et al* 1973, Hayes *et al* 1999)와 GSH, vitamin C 및 E 등 비단백성 ROS 소거제(Flohe *et al* 1973, Hayes *et al* 1999)에 의해 제거된다. 고혈당성 당뇨 상태에서는 ROS 생성계는 활성화되는 반면 ROS 소거 활성은 감소한다(Aliciguzel *et al* 2003). SOD는 superoxide를 반응성이 낮은 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환시키며(Im *et al* 1985), GST는 LPO 등 유기태의 hydroperoxide를 lipid alcohol로 전환시킴으로써 무독화 한다(Jacoby JB 1978). 본 실험에서는 삼나무 에탄올 추출물 식이가 STZ로 유발한 당뇨쥐에서 간 조직의 ROS 소거에 관여하는 효소류의 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4). 그 결과 DM군에서는 NC군에 비하여 SOD 및 GST가 34.23~49.54%가 감소하였으나, SA군과 SB군에서는 DM군에 비하여 각각 56.84~94.90% 및 57.14~68.92%가 증가하였으며, 상호간의 유의적인 차이가 있었다.

이상의 실험 결과들을 종합해 볼 때 삼나무 에탄올 추출물은 STZ로 유도한 고혈당을 완화시키는 항당뇨 작용과 더

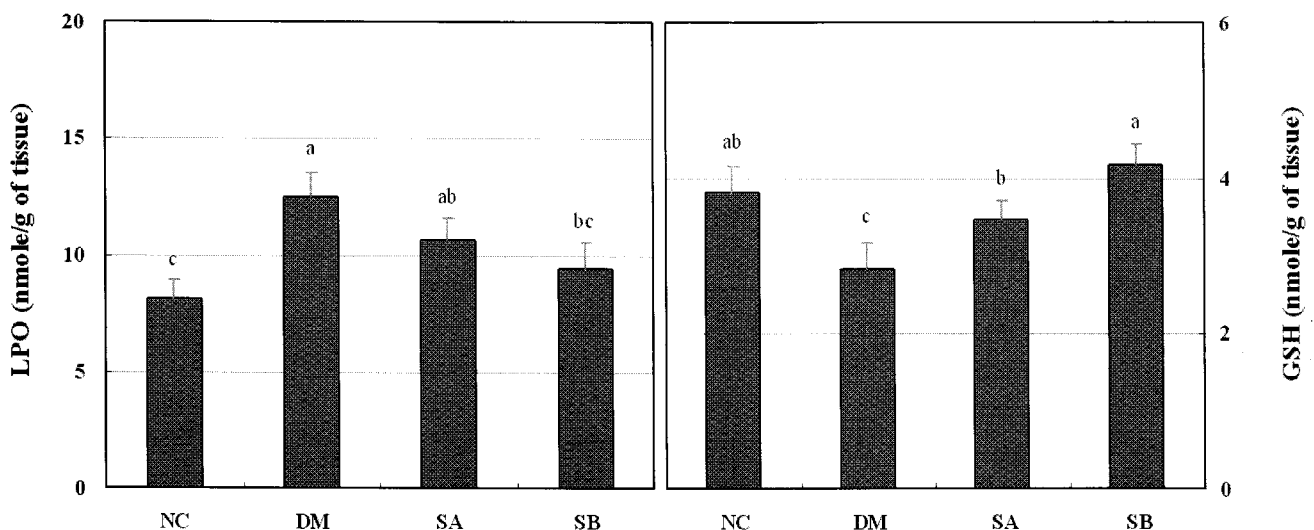


Fig. 3. Effect of goat's beard ethanol extracts on the level of LPO and GSH in STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks. Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts. Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts within a column(a~c) indicate significant differences $p < 0.05$.

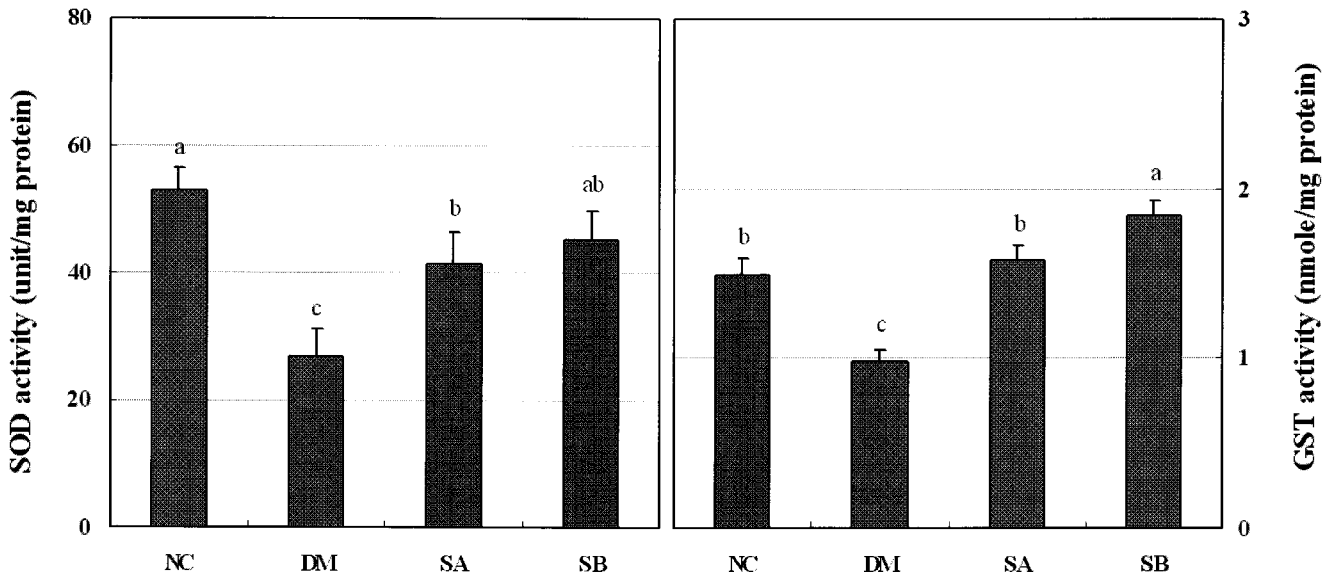


Fig. 4. Effect of goat's beard ethanol extracts on the SOD and GST activity in the liver of STZ-induced diabetic rats fed for 5 weeks. Abbreviations: NC; normal control, DM; diabetic control, SA; diet with 0.3% goat's beard ethanol extracts, SB; diet with 0.6% goat's beard ethanol extracts. Values are mean±SD of 7 rats. Different superscripts within a column(a~c) indicate significant differences $p < 0.05$.

불어 ROS 생성계를 억제하며, 동시에 ROS 소거계의 활성을 증가시켜 고혈당에 의한 조직 손상을 예방 및 경감시켜 주는 것으로 사료된다.

요 약

삼나물 에탄올 추출물이 streptozotocin으로 유발한 쥐의 당뇨증상과 산화적 스트레스에 미치는 영향을 조사하였다. 실험군은 정상군(NC), 당뇨군(DM), 당뇨유발 후 식이에 삼나물 에탄올 추출물을 0.3%를 첨가한 식이군(SA), 당뇨유발 후 식이에 삼나물 에탄올 추출물을 0.6% 첨가한 식이군(SB)으로 구분하여 5주간 사육하였다. SA군과 SB군은 NC군에는 미치지 못하였으나, 당뇨로 인해 초래되는 병리적 증상인 체중 감소, 식이섭취량 및 음용수 섭취량의 증가, 식이효율저하, 간장 및 신장 무게의 증가 현상을 개선하는 효과가 있었다. 실험식으로 5주간 사육한 당뇨쥐의 혈당은 DM군에 비하여 17.9~27.2%를 감소시켰으며 fructosamine의 함량은 25.6~32.6%를 감소시켰다. 또한, 당뇨로 인하여 증가된 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 활성을 각각 25.6 및 30.3% 감소시켰다. SA 및 SB군은 DM군에 비하여 혈청 중성지질은 42.37~55.51% 감소, total cholesterol 함량은 26.85~30.44% 감소, HDL-cholesterol 함량은 13.01~17.35% 증가, LDL-cholesterol 함량은 37.29~39.11%가 감소하였다. SA 및 SB군의 xanthine oxidoreductase의 total type, O type 및 O/T(%)은 DM군에 비하여 유의적으로 감소하였

으며 간 조직 glutathione 함량은 유의적으로 증가 lipid peroxide 함량은 유의적으로 감소시켰다. Superoxide dismutase와 glutathione S-transferase 활성도 DM군에 비하여 각각 56.84~94.90% 및 57.14~68.92%를 증가시켰다.

이상의 실험 결과 삼나물 에탄올 추출물은 STZ로 유도한 당뇨쥐의 고혈당을 완화시키고 동시에 ROS 생성계를 억제하고 ROS 소거계를 활성화시킴으로써 당뇨를 경감시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구 과제는 2007년도 울릉군의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U (2003) Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 142: 172-177.
 Annual report on the cause of death statistics (2002) *Korea National Statistical Office* 21.
 AOAC (1984) *Official Methods Analysis* 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC.
 Beppu H, Maruta K, Kurner T, Kolb H (1987) Diabetogenic

- action of streptozotocin: essential role of membrane permeability. *Act Endocrinol(Copdn)* 114: 90-96.
- Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M (2006) Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem* 281: 9307-9313.
- Bhattacharya S, Dey D, Roy SS (2007) Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32: 405-413.
- Demetriou JA (1987) Glycosylated proteins. "Methods in Clinical Chemistry" Pesce AJ, Kaplan LA eds, Mosby Co, Washington DC, USA, pp 113-123.
- Dey D, Mukherjee M, Basu D, Datta M, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S (2005) Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. *Cell Physiol Biochem* 16: 217-228.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett* 32: 132-134.
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett* 32: 132-134.
- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of the low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
- Goren T, Castelli WP, Hjordland MC, Kannel WB, Dawber TR (1997) High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The framingham study. *Am J Med* 62: 707.
- Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan F, Aris IM, Jacoby WB (1974) The identification of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci* 71: 3879-3882.
- Ham YK, Kim SW (2004) Protective effects of plant extract on the hepatocytes of rat treated with carbon tetrachloride. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 33: 1246-1251.
- Hashim MS, Lincy S, Remya V, Teena M, Anila L (2005) Effect of polyphenolic compounds from *Coriandrum sativum* on H₂O₂-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Food Chem* 92: 653-660.
- Hayes JD, McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res* 31: 273-300.
- Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE (1985) Effects of superoxide dismutase and allopurinol in survival of acute island skin flaps. *Ann Surgery* 201: 357-359.
- Jacoby JB (1978) The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 46: 383-414.
- Jenkins AJ, Klein RL, Chassereau CN (1996) LDL from patients with well-controlled IDDM is not more susceptible to *in vitro* oxidation. *Diabetes* 45: 762-767.
- Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR (1982) Fructosamine : a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clinica Chimica Acta* 127: 87-95.
- Kang MH, Lee JH, Lee JS, Kim JH, Chung HK (2004) Effect of acorn supplementation on lipid profiles and antioxidant enzyme activities in high fat diet-induced obese rats. *The Kor Nutr Soc* 37: 169-175.
- Kannel WB, Mcgee DL (1979) Diabetes and cardiovascular disease. The framingum study. *JAMA* 241: 2035-2038.
- Kaplan LA, Stein EA (1984) Analysis of glycosylated proteins compared with glycsylated hemoglobin measures by affinity and ion-exchange chromatography. *Clin Chem* 30: 979 (A).
- Karmen A (1955) A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 34: 131-133.
- Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A (1978) Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *New Engl J Med* 295: 417-420.
- Lee CB (2003) Coloured flora of Korea. Hyangmoonsa, Seoul. pp 515-516.
- Lee IS, Lee SW, Lee IZ (2003) Effects of tissue cultured ginseng on blood glucose and lipid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol* 35: 280-285.
- Lee SY, Lee CY, Park YC, Kim JB (2007) Effects of Hambag mushroom(*Grifola frondosa*) on oxidative stress in diabetic rats. *J Life Sci* 17: 1571-1575.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL (1951) Protein measurement folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Martin JP, Dailey JM, Sugarmanand E (1987) Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 255: 329-336.

- Nohl H, Jordan W (1980) The metabolic fate of mitochondrial hydroxyperoxide. *Eur J Biochem* 111: 203-210.
- Oei HH, Kentroo WE, Burton KP, Schaffer SW (1982) A possible role of xanthine oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38: 453-461.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 248-254.
- Park BH, Shin JW, Lee SI, Kim SD (2008) The effects of *Cudrania tricuspidata* tea leaves on the blood glucose and serum lipids profiles of streptozotocin induced hyperglycemic rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 18: 516-523.
- Park GY, Lee SJ, Lim JG (1997) Effects of green tea catechin on cytochrome P₄₅₀, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 26: 901-907.
- Park KS, Lee DE, Shung JH, Chung SH (2002) Comparisons of antidiabetic effect of *Panax ginseng* on MLD STZ-induced diabetic rats terms of time of administration. *J Ginseng Res* 26: 191-195.
- Reitman S, Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic transaminase. *AM J Clin Pathol* 28: 58-63.
- Satho K (1978) Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 90: 37-43.
- Shin KO, Lee SI, Kim SD (2005) Effect of *Acanthopanax senticosus* extracts on blood sugar and serum lipid profiles of streptozotocin induced diabetic rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 549-557.
- Shin KO, Lee SI, Kim SD (2008) Diet of red ginseng-cheonggukjang improves streptozotocin-induced diabetes symptoms and oxidative stress. *Food Sci Biotechnol* 17: 287-294.
- Smith OLK, Wong CY, Gelfand RA (1989) Skeletal muscle proteolysis in rat with acute streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 38: 1117-1122.
- Sochor M, Kunjara S, Baquer NZ, Malean P (1991) Regulation of glucose metabolism in livers and kidneys of NOD mice. *Diabetes* 40: 1467-1471.
- Stripe F, Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3860.
- Urano S, Midori H, Tochihi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H (1991) Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposome to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26: 58-62.
- Wang RS, Nakajima T, Honma T (2000) Different change patterns of the isozymes of cytochrome P₄₅₀ and glutathione S-transferase in chemically induced liver damage in rat. *Ind Health* 37: 440-448.

(2008년 7월 10일 접수, 2008년 12월 1일 채택)