

고혈당 쥐의 췌장 효소활성에 미치는 Nicotinamide의 영향

손기호[†] · 김석환* · 최종원**

왈레스기념 침례병원 약제부

*동아대학교 식품영양학과

**경성대학교 약학대학

Pretreatment with Nicotinamide to Prevent the Pancreatic Enzymes Changes by Streptozotocin in Rats

Kie-Ho Sohn[†], Seok-Hwan Kim* and Jong-Won Choi**

Dept. of Pharmacy, Wallace Memorial Baptist Hospital, Pusan 601-013, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-a University, Pusan 604-714, Korea

**College of Pharmacy, Kyung-sung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

The present study was undertaken in order to elucidate the effects of pretreatment with nicotinamide on changes in serum glucose level, body weight, water consumption, serum insulin concentration, and the activity of pancreatic enzyme in rats treated with streptozotocin (STZ). Histological studies were also carried out to evaluate the effects on pancreatic tissues and Langerhans' s islet cells. Nicotinamide pretreatment in STZ diabetic rats inhibited the rise of fasting serum glucose concentration and water consumption. Pretreatment with nicotinamide significantly increased the concentration of serum insulin and body weight changes compared to the STZ-treated group. Pancreatic lipase and trypsin activities were increased, but amylase activity was decreased and pancreatic β -cell was destroyed by STZ. Pretreatment with nicotinamide prevented these STZ-induced changes. These results suggest that nicotinamide pretreatment suppresses STZ-induced changes in pancreatic enzymes by preventing β -cell destruction and therefore maintaining a normal serum insulin level.

Key words : streptozotocin, hyperglycemic, pancreatic enzyme, nicotinamide

서 론

당뇨병은 췌장에 있는 Langerhans섬의 β 세포에서 분비되는 insulin의 생리작용이 저조하거나 insulin-receptor의 수가 적어 insulin의 생리적 기능이 충분하지 못할 때 나타나는 고혈당의 한 증상으로 뇨중에 당이 검출되는 현상을 말한다¹⁾.

당뇨가 유발되면 insulin과 glucagon의 분비상태가 교란되어 탄수화물뿐만 아니라 단백질 및 지질대사 등 생체내 대사조절기능에 이상이 생겨 여러가지 대사성 질환이 나타나게 되며 당뇨병상이 오래 지속되면 모세혈관의 상피세포막의 비후가 일어나 순환기계등에 많은 합병증이 유발 된다²⁾.

Insulin 생성부전에 의하여 나타나는 insulin 의존형 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus)은 오랜 기간에 걸쳐서 서서히 진행되는 자가 면역기전에 의해

[†]To whom all correspondence should be addressed

췌장의 β 세포가 파괴되어 발생하는 질환으로서 유전적 감수성과 각종 환경인자가 관련되는 것으로 알려져 있다²⁻⁵.

근년에 와서는 nicotinamide가 당뇨병 유발시 실험실적으로 사용되는 streptozotocin (이하 STZ로 약함)의 당뇨기전을 억제 시키고⁶⁻⁹ 당뇨병 nephropathy의 진행을 지연시키며¹⁰ 당뇨병 지질변동의 방어¹¹ 및 간장에서의 약물대사 효소변동을 저지시킨다는 등의 보고¹²는 있으나 췌장 효소변동에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 nicotinamide의 전처리가 STZ에 의하여 췌장내에서 증가되는 poly (ADP-ribose) synthetase의 작용을 억제하여 STZ에 의하여 야기되는 당뇨작용을 저지할 것이라는 작용 이외에 췌장 효소변동에 미치는 영향을 췌장의 조직학적인 검사를 병행하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물은 일정한 조건(온도 : 20~22°C, 습도 : 50%, 명암 : 12시간 주기 조명)하에서 사육한 Sprague-Dawley계 숫쥐(200~250g)를 4군으로 나누어 생리식염수로 7일간 1일 2회 전처리한 후 0.01M citrate buffer (pH 4.5)를 꼬리 정맥에 1회 주사한 군을 대조군으로, nicotinamide (200mg/kg)를 1일 2회 7일간 경구 투여한 후 citrate buffer를 1회 주사한 군을 nicotinamide 투여군으로, 생리식염수로 7일간 전처리 한후 STZ (50mg/kg)를 1회 주사한 군을 STZ투여군으로, nicotinamide를 7일간 전처리한 후 STZ를 1회 투여한 군을 nicotinamide 전처리군으로 하였고 STZ주사 7일 후 혈청중 당의 농도가 200mg/dl이상인 것을 당뇨병 유발로 간주하였다.

실험동물은 24시간 동안 물만 먹이고 절식시킨 후 CO₂ gas로 마취하여 심장에서부터 채혈후 혈청을 분리하고 glucose oxidase법에 따라 조제된 kit (Exactech® blood glucose strip)를 사용하여 혈당을 정량하였고 뇨당의 측정에는 영동 strip (GEN-8)을 사용하였으며 혈청중 insulin의 함량은 Wilson 등의 방법에 준하여 조제된 RIA kit를 사용하여 radio-immuno assay 법으로 하여 γ -counter로 측정하였다.

적출한 췌장은 Duan 등¹³의 방법에 준해 0.01M KCl, 0.02M CaCl₂, 0.01M Tris, 0.01% (v/v) Triton을 함유하는 용액(pH 8.0)을 가하여 마쇄하고 이 마쇄 균질액을 사용하여 amylase 및 lipase의 활성은 Ceska¹⁴와 Erlanson-Albertsson 등¹⁵의 방법에 준해 조제된 kit (Nephelometer-amylase, -lipase)를 사용하여 trypsin의 활성은 Folkensson 등¹⁶의 방법에 준해 측정하였다.

단백질의 정량은 Lowry의 방법¹⁷에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

본 실험에서 얻어진 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하였다. 췌장 조직검사는 Ambrogi의 방법¹⁸에 따라 hematoxylin-eosin으로 염색하였고 췌장중 islet β -cell검사는 Gomori's aldehyde fuchsin법¹⁹에 의하였다.

결과 및 고찰

수분섭취량 및 체중의 변동

Nicotinamide를 7일간 전처리하고 STZ를 투여하여 유도한 당뇨병 쥐에서 항 당뇨병세를 관찰할 목적으로 수분섭취량, 체중 및 체중 대 간장 무게비에 미치는 영향을 관찰한 결과가 Table 1이다.

STZ를 투여하여 당뇨작용을 유발시킨 실험동물에서는 정상동물보다 체중은 76% 억제되었으며 수분섭취

Table 1. Effect of nicotinamide on body weight change and water consumption in STZ-induced diabetic rats

Treatment	Body weight change (%)	Liver / body weight (%)	Water consumption (ml / day)
Control	9.2 ± 1.16 ^a	3.72 ± 0.55 ^a	10.4 ± 1.44 ^a
STZ	-16.8 ± 2.22 ^b	4.80 ± 0.71 ^b	33.7 ± 3.84 ^b
NICO	7.14 ± 1.75 ^a	4.01 ± 0.64 ^{a,b}	12.7 ± 2.91 ^a
NICO+STZ	3.1 ± 0.64 ^c	3.87 ± 0.64 ^{a,b}	17.3 ± 2.91 ^a

Nicotinamide (200mg / kg) was orally administered to rats - in 0.1ml sterile saline - twice a day for seven days, and then STZ (50 mg / kg) - in 0.2ml 0.01M citrate buffer (pH 4.5) - was injected via tail vein

Values are mean ± S.D. (n=6). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0.05)

량은 324%로 증가되었다. Nicotinamide를 전처리하고 STZ를 투여함으로써 체중 및 수분섭취량의 변동이 억제되었으며 체중 대 간장 무게비가 STZ에 의하여 다소 증가되던 경향이 nicotinamided의 전처리로 개선되었다.

혈당, 뇨당 및 혈중 insulin 함량변화

STZ에 의한 혈당, 뇨당 및 혈중 insulin농도에 미치는 nicotinamide의 영향을 나타낸 결과가 Table 2이다.

STZ에 의하여 혈중 insulin농도가 16.5±4.24μIU/ml로 대조군의 46.0±6.17μIU/ml에 비해 약 35%로 현저히 감소되었으며 혈당은 각각 365.4±14.4mg/dl 및 121.0±6.0mg/dl로 약 294%로 증가되었고 뇨당에서도 혈당에서와 유사한 증가를 볼 수 있었다.

한편 nicotinamide를 전처리함으로써 STZ에 의하여 유도된 혈중 insulin농도는 STZ군에 비해서 증가되었으며, 혈당 및 뇨당으로 부터 관찰된 당뇨증세가 정상 동물에 가깝게 억제되었다. 이는 nicotinamide가 NAD의 전구체로서 STZ에 의한 poly (ADP-ribose) synthetase의 overactivation의 결과 세포내 NAD가 과잉 소모되는 것으로 부터 세포내 NAD의 농도를 일정하게 유

지시켜 줌과 동시에 poly (ADP-ribose) synthetase의 활성을 억제한다²⁰⁻²²⁾는 보고와 연관시켜 볼 때에 nicotinamide의 전처리가 STZ에 의한 당뇨병 유발을 예방할 것이라는 결과를 뒷받침하고 있으며 또한 STZ에 의해 현저히 억제되던 혈중 insulin농도가 nicotinamide를 전처리함으로써 STZ에 의한 insulin농도감소가 회복되는 점과 연관시켜 볼때 매우 흥미있는 결과로 생각된다.

췌장중 효소활성변동

당뇨병 유발의 주 관여 장기가 췌장으로 알려져 있으며 insulin의 생성도 췌장의 β세포에 의해 조절되는 것으로 췌장 중의 효소변동에 어떤 영향을 주는가를 관찰할 목적으로 STZ투여군과 nicotinamide를 7일간 전처리하고 STZ를 투여한 군의 췌장중 amylase, lipase 및 trypsin의 효소활성을 관찰한 성적이 Table 3이다.

STZ에 의해서 lipase, trypsin의 활성은 대조군에 비해서 각각 276.3±40.27 mU/mg protein, 85.5±9.10 mU/mg protein으로 약 200% 및 132%로 유의성 있는 증가를 나타내었으나 nicotinamide의 전처리로 각각 168.9±46.4mU/mg protein, 61.5±7.09mU/mg pro-

Table 2. Effect of nicotinamide on the level of blood glucose, insulin, and urine glucose in STZ-induced diabetic rats

Treatment	N	Blood glucose (mg / dl)	Blood insulin (μIU / ml)	Urine glucose*
Control	5	121.0± 6.0 ^{a,c}	46.0±6.17 ^a	-
STZ	6	365.4±14.4 ^b	16.5±4.24 ^b	+++
NICO	5	147.7±12.6 ^a	42.3±7.5 ^a	-
NICO+STZ	6	178.0±11.4 ^a	39.2±7.4 ^a	-~+

Nicotinamide (200mg / kg) was orally administered to the rats - in 0.1ml sterile saline - twice a day for seven days, and then STZ (50 mg / kg) - in 0.2ml 0.01M citrate buffer (pH 4.5) - was injected via tail vein

The rats were sacrificed 7 days later for blood testing. Values are mean ±S.D. Values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

* : - : Negative, + : 250 mg / dl, ++ : 500 mg / dl, +++ : 1 g / dl

Table 3. Effect of nicotinamide on the activities of pancreatic amylase, lipase and trypsin in STZ-induced diabetic rats

Treatment	Amylase	Lipase	Trypsin
	(mU / mg protein)		
Control	26.80±4.43 ^{a,1,2)}	138.4±14.9 ^a	64.6±9.1 ^a
STZ	6.62±1.88 ^b	276.3±40.2 ^b	85.5±9.1 ^b
NICO	26.10±5.77 ^a	143.9±14.9 ^a	69.3±8.7 ^a
NICO+STZ	20.50±2.68 ^c	168.9±46.4 ^a	61.5±7.1 ^a

¹⁾ Mean ±S.D. (n=6)

²⁾ Mean followed by the same letter are not significantly different

³⁾ For experimental details : see materials and methods (p<0.05)

tein으로 감소되어 대조군과 비교하여 거의 차이가 없었다.

그러나 amylase활성에 있어서는 STZ투여로 효소의 활성이 $6.62 \pm 1.88 \text{ mU/mg protein}$ 으로 대조군의 약 25%로 유의있는 억제 현상을 나타내었으며 nicotinamide의 전처리로 $20.5 \pm 2.68 \text{ mU/mg protein}$ 으로 증가되나 대조군에 비해서는 약 24%정도 활성이 감소되는 경향을 나타냈다. 이러한 STZ투여에 의한 췌장중 lipase, trypsin의 활성증가는 insulin 결여시 m-RNA농도의 증가에 의해 일어나며^{23,24)} lipase 및 trypsin의 활성과 amylase활성에 미치는 영향이 상반되게 나타나는 것은 당뇨상태에서 탄수화물 대신에 단백질 및 지방의 소화흡수가 증가된 결과라는^{25,26)} 보고와 연관시켜 볼 때에 nicotinamide의 전처리로 효소활성이 회복되는 것은 혈중 insulin량과 관련되는 것으로 보인다.

췌장 조직변화 및 islet β 세포에 미치는 영향

STZ투여가 췌장조직 및 islet β 세포에 미치는 영향을 관찰한 결과가 Fig. 1 및 Fig. 2이다.

생리식염수와 nicotinamide만을 투여한 군과 STZ투여군 및 nicotinamide를 전처리하고 STZ를 투여한 군에서의 췌장조직을 광학현미경으로 400배율로 조사하였을 때 외분비 세포 및 islet의 특이한 변화가 관찰되지 않았고 islet β 세포를 Gomori's aldehyde fuchsin염색법으로 염색 후 1,000배율로 조사하였을 때 STZ의 투여로 인하여 islet내 β -cell가 파괴되었으며 nicotinamide의 전처리로 STZ에 의한 islet β 세포의 손상이 대조군과 유사하게 잘 보존되고 있음을 보여주고 있다. 이와같이 췌장의 조직학적인 소견으로도 STZ투여로 췌장의 분비세포가 정상으로 유지되어 췌장염증시 나타나는 혈중 lipase활성 증가는 전보에서 보고된 바와 같이 도리어 감소되는 결과와 일치하고 있으며 Gomori's aldehyde fuchsin염색법으로 췌장의 islet β 세포를 관찰한 결과 STZ투여로 β -cell의 대량파괴가 나타나 nicotinamide의 전처리로 STZ에 의한 손상으로 부터 잘 보호되고 있는 것으로 보아 nicotinamide의 전처리가 STZ를 투여함으로써 나타나는 췌장의 세포의 괴사를 방지하여 항 당뇨작용의 일환인 생리적인 현상의 조절 및 췌장효소활성의 변동을 조절하여 주는 것으로 생각된다.

이상의 실험결과는 nicotinamide를 전처리함으로써 STZ에 의하여 유도되는 당뇨병시 나타나는 여러가지 생리적 현상 즉, 혈당, 뇨당, 혈중 insulin농도, 췌장중

몇 가지 효소의 변동 등과 같이 STZ 투여시 야기되는 생리적 불균형을 개선하여 준다는 사실을 뒷받침하는 것으로서 당뇨병시 나타나는 여러가지 역작용의 예방에 nicotinamide가 유용하게 응용될 수 있을 것으로 생각되며 나아가 췌장 Langerhans's islet β 세포 파괴로 인하여 야기되는 당뇨병의 예방 및 치료에 nicotinamide를 사용할 수 있는 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

요 약

Nicotinamide의 항 당뇨작용을 연구할 목적으로 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 흰 쥐를 모델동물로 하여 수분섭취량과 체중, 혈당, 뇨당 및 혈중 insulin함량과 췌장중 효소변동을 형태학적인 측면과 함께 상호 비교 관찰하였다. Nicotinamide의 전처리로 STZ에 의해 유발되는 당뇨병시 나타나는 생리적 현상의 감소 및 혈당증가가 유의성있게 감소되었으며 혈중 insulin농도도 STZ에 의해 현저히 억제되던 것이 nicotinamide의 전처리로 정상수준으로 회복되었다. 혈청중 lipase 및 trypsin활성은 STZ투여에 의해 증가되었으며, amylase활성은 대조군에 비해서 억제되었으나 nicotinamide의 전처리로 lipase, trypsin 및 amylase활성이 회복되었다. 췌장의 형태학적인 변화에서는 STZ투여로 췌장 소염세포 및 췌관을 포함하는 외분비계의 조직에는 변화가 없으나 Langerhans's islet β 세포가 심하게 파괴되었고 nicotinamide의 전처리로 β 세포의 파괴가 현저하게 감소되었다.

문 헌

1. Campbell, R. K. and Steil, C. F. : *Diabetes, clinical pharmacy and therapeutics*. Willaims & Wilks, 4th ed., p.176(1988)
2. Eisenbarth, G. S. : Type 1 diabetes mellitus ; A chronic autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 1360 (1986)
3. Rayfield, E. J. and Ishimura, K. : *Enviromental factors and insulin-dependent diabetes mellitus*. *Diabetes Metab. Rev.*, **3**, 925(1987)
4. Yoon, J. W., Kim, C. J., Park, C. Y. and Acarthur, R. G. : Effect of environmental factors on development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinic. Invest. Med.*, **10**, 459(1987)
5. Nepon, G. T. : A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations. *Diabetes*, **39**, 1153

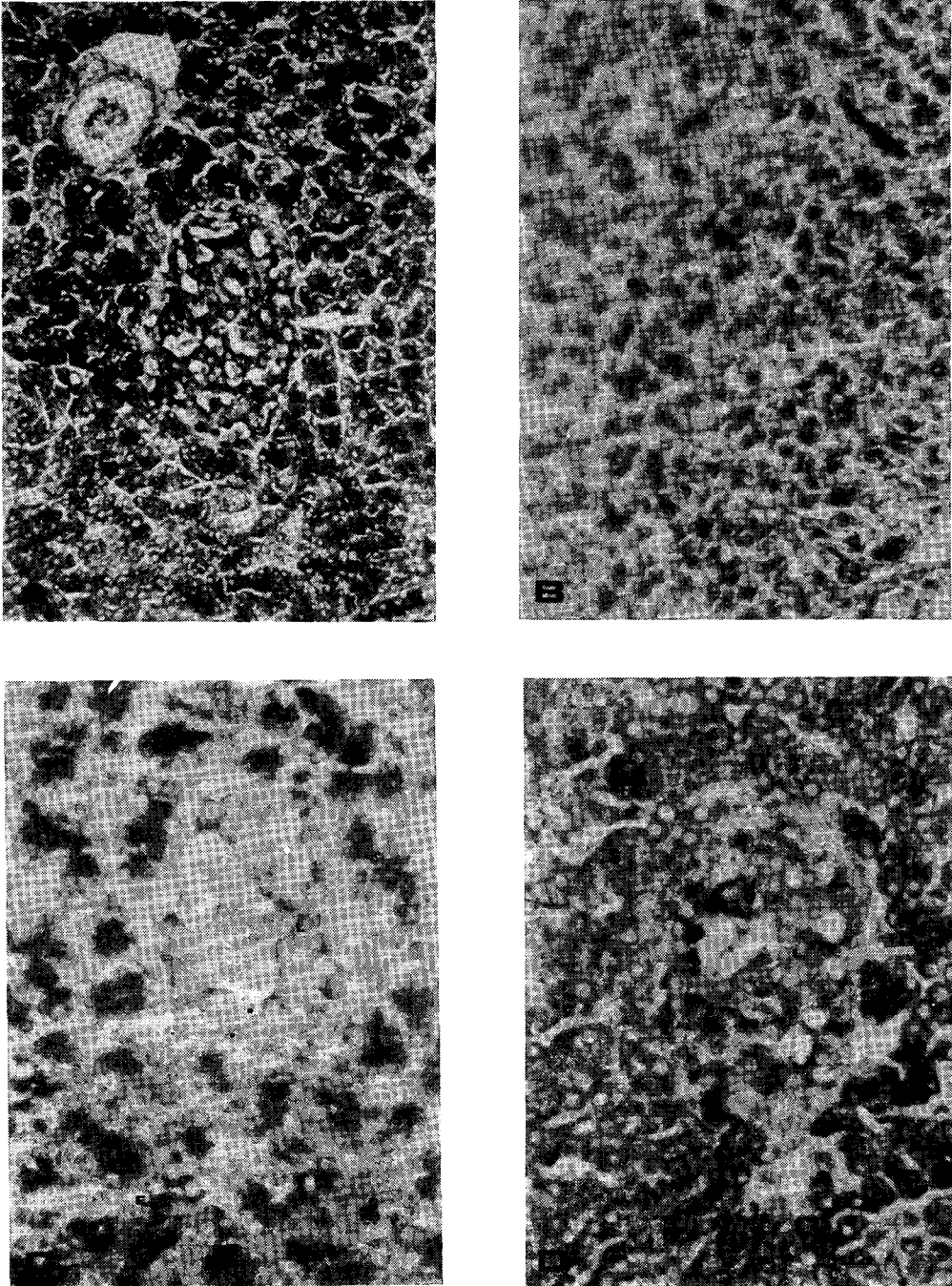


Fig. 1. Photomicrographs of pancreatic tissue in rat (Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$).

- A. Pancreas section from control rat. The pancreas structure is essentially normal. E ; exocrine gland, L ; Langerhans' s islet.
- B. Pancreas section from rat treated with nicotinamide (200mg / kg).
- C. Pancreas section from rat treated with STZ (50mg / kg).
- D. Pancreas section from rat pretreated with nicotinamide and STZ.
Nicotinamide (200mg / kg) was orally administered to the rats daily seven days, and then sacrificed seven days after STZ (50mg / kg, tail vein).

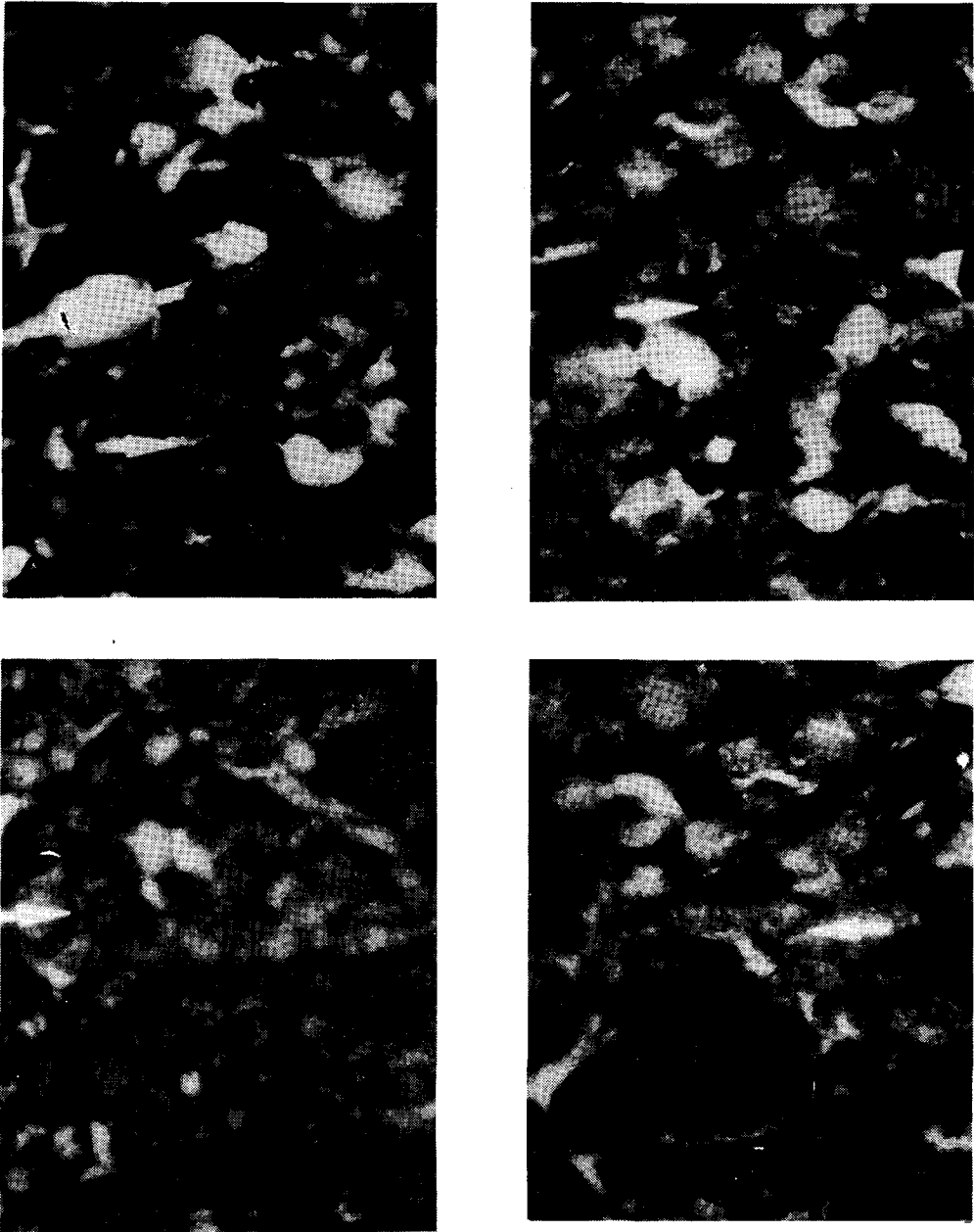


Fig. 2. Photomicrographs of Langerhans' s islet in rat (Gomori' s aldehyde fuchsin stain, $\times 1,000$).

- A. Pancreas section from control rat. The pancreas Langerhans' s islet β -cell is essentially normal. B ;Langerhans' s islet β -cell.
- B. Pancreas section from rat treated with nicotinamide (200mg / kg).
Langerhans' s island β -cell is similar to control rat.
- C. Pancreas section from rat treated with STZ (50mg / kg).
Langerhans' s island β -cell shows destruction.
- D. Pancreas section from rat pretreated with nicotinamide and STZ.
Langerhans' s island β -cell destruction is diminished compared with that in C.
Nicotinamide (200mg / kg) was orally administered to the rats for seven days, and then sacrificed seven days after STZ (50mg / kg, tail vein).

- (1990)
6. Hayek, A., Barela, T., Wogenrich, F. and Guardian, C. M. : Fetal rat islet insulin deficiency following maternal administration of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **180**, 209(1985)
 7. LeDoux, S. P., Woodley, S. E., Patton, N. J. and Wilson, G. L. : Mechanism of nitrosourea induced β -cell damage. *Diabetes*, **35**, 866(1986)
 8. Eizirik, D. L., Sandler, S., Welsh, N. and Hellerstron, C. : Preferential reduction of insulin production in mouse pancreatic islet maintained in culture after streptozotocin exposure. *Endocrinology*, **122**, 1242 (1988)
 9. Sandler, S. and Swenne, I. : Effect of streptozotocin exposure in vitro replication and repair of DNA in fetal rat pancreatic islet cells. *Pancreas*, **4**, 53(1989)
 10. Wablberg, G., Carlson, L. A. and Ljungvist, A. : Protective effect of nicotinamide against nephropathy in diabetic rats. *Diabetes Res.*, **2**, 307(1985)
 11. 최중원, 손기호, 김석환 : Nicotinamide가 streptozotocin 당뇨성 쥐의 혈청 지질 성분에 미치는 영향. 한국영양학회지, **20**(4), 306(1991)
 12. Choi, J. W., Sohn, K. H. and Kim, S. H. : Effect of pre-treatment with nicotinamide on changes in the hepatic metabolizing enzyme system induced by streptozotocin. *J. Korean Soc. Food. Nutr.*, **20**(3), 203(1991)
 13. Duan, R. D., Poensgen, J., Wicker, C., Westrom, B. and Albertsson, C. E. : Increased in pancreatic lipase and trypsin activity and their mRNA levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Dig. Dis. Sci.*, **34**, 243 (1989)
 14. Ceska, M. and Birath, K. : A new rapid method for the clinical determination of alpha-amylase activities in human serum and urine. Optimal conditions. *Clin. Chim. Acta.*, **26**, 437(1969)
 15. Erlanson-Albertsson, C., Larsson, A. and Duan, R. D. : Secretion of pancreatic lipase and colipase from rat pancreas. *Pancreas*, **2**, 531(1987)
 16. Folkesson, H. G., Weström, B. R., Lundin, S. and Karlsson, B. W. : Decreased passage of the nonapeptide dNAVp over the intestinal epithelium during development in the young rat. *Acta. Physiol. Scand.*, **133**, 283(1988)
 17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 18. Ambrog, L. P. : Manual of histologic and special staining technics. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C. (1975)
 19. Gomori, G. L. : *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*, American Registry of Pathology, 3ed. p.78(1978)
 20. Vialettes, B., Lassmann-Vague, V. and Vallo, J. J. : Nicotinamide may extend remission phase in insulin-dependent diabetes. *Lancet*, **3**, 619(1987)
 21. Wright, J. R., Mendola, J. and Lacy, P. E. : Effect of niacin/nicotinamide deficiency on the diabetogenic effect of streptozotocin. *Experientia*, **44**, 38(1988)
 22. Strandell, E., Eizirik, D. L. and Sandler, S. : Survival and β -cell function of mouse pancreatic islet maintained in culture after concomitant exposure to streptozotocin and nicotinamide. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **93**, 219(1989)
 23. Söling, H. D. and Unger, K. O. : The role of insulin in the regulation of α -amylase synthesis in the rat pancreas. *Eur. J. Clin. Invest.*, **2**, 199(1972)
 24. Kore, M., Owerbach, D., Quinto, C. and Rutter, W. J. : Pancreatic islet-acinar cell interaction: Amylase messenger RNA levels are determined by insulin. *Science*, **213**, 351(1981)
 25. Wicker, C. and Puigserver, A. : Effect of inverse changes in dietary lipid and carbohydrate on the synthesis of some pancreatic secretory proteins. *Eur. J. Biochem.*, **162**, 25(1987)
 26. Steinbilber, W., Poensben, J., Rauch, U., Kern, H. F. and Scheele, G. A. : Translational control of anionic tryosinogen and amylase synthesis in rat pancreas in response to caerulein stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 6597(1988)

(1992년 1월 30일 접수)