

Streptozotocin 유발 당뇨병쥐 뇌에서 Gangliosides 대사 변화와 녹용의 효과

조현진 · 전길자*

이화여자대학교 화학과

Changes of Gangliosides Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats and Effect of Deer Antler

Hyun Jin CHO and Gil Ja JHON*

Dept. of Chemistry, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received August 29, 1994; accepted October 10, 1994)

Abstract—In this study, we examined gangliosides from streptozotocin-induced diabetic rat brain. To obtain the diabetic rat brain, we sacrificed the rat three days after injecting the streptozotocin into venus in tail. We measured blood glucose level according to Somogy-Nelson method and measured insulin level using ¹²⁵I-insulin RIA kit. The gangliosides were extracted according to Folch-Suzuki method from the rat brain. We also examined the effect of major lipid components extracted from deer antler on diabetic rat brain. The results showed that the major lipids components lowered both blood glucose and insulin level in normal rat. However, only the blood glucose level in diabetic rat was lowered with major lipid components. In diabetic rat brain, gangliosides metabolism were changed. The amount of GM1a was increased while GD1a, GD1b, and GT1b were not synthesized. Furthermore, undefined ganglioside was found. In major lipid component-treated diabetic rat brain, the ganglioside metabolism proceeded as same as the normal rat. On the contrary, in bovine brain gangliosides-treated diabetic rat brain, the gangliosides metabolism was not recovered to normal one.

Keywords □ gangliosides, deer antler, diabetic rat.

당뇨병은 여러 기관에서 나타나는 구조적, 기능적 이상과 관련된 대사이상 질환으로 중추 신경계의 역기능을 수반한다. 당뇨병의 경우 중추 신경계 역기능의 결과로 대뇌혈관에 동맥경화가 나타나며(Grunnet, 1963), 대뇌에 존재하는 전해질의 양과 뇌와 연관된 대사등이 변하게 되고(Webb와 Mohan, 1981), 혈관-뇌세포벽이 손상을 입게 된다. 동물실험에 의하면 당뇨병이 있는 뇌에서는 ideogenic osmole이라고 부르는 활성을 가진 물질이 생성된다(Arief와 Kleeman, 1973). 혈당이 300 mg/dl 이상인 경우에는 기억에 손상을 가져오게 되는데, 그 이유는 혈장의 삼투질 농도가 변해서 신경 전달 속도에 당이 직접적으로 유독한 영향을 미치기 때문이다. 또한 당에 의한 유독한 효과로는 신경 전달 물질의 수용체를 변형시킨다는 보고가 있다(Cherkin과 Flood, 1985). Ganglio-

sides는 당뇨병쥐의 좌골신경계에서 methionine uptake를 증가시키고, 당뇨병성 신경 장애로 감소된 Na⁺/K⁺-ATPase를 활성화 시키고 위축된 신경 돌기의 성장을 증진시키므로 신경 세포의 회복을 촉진시킨다는 보고도 있다(Benech 등, 1990).

Gangliosides에 관한 최근의 활발한 연구로 여러가지 생리적 기능들이 제시되고 있다. 즉 gangliosides는 세포 분화(Nojiri 등, 1986) 및 세포 성장(Bremer 등, 1984; Daniotti 등, 1992)의 조절에 중요한 역할을 하고 있으며, 암세포의 항원, 세포 분화에 있어 표지물질 역할을 한다. 또한 gangliosides는 단백질 인산화의 조절인자(Chan, 1987; Hilbush와 Levine, 1991)와 수용체로서의 역할을 하며, 세포막 유동성을 변화시키는(Saqr 등, 1993) 등 다양한 생물학적 활성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 개체발생, 세포 분화, 종양 발생시의 형질도입 그리고 세포간 접촉에 의한 성장저해가 일어날 때 gangliosi-

*To whom correspondence should be addressed.

des의 조성이 변하고, 또 gangliosides의 대사가 조절됨이 관찰되었다(Yates 등, 1993). 따라서 특정 상태에 있는 세포에서의 gangliosides의 분포와 조성의 변화를 관찰하는 것은 의미가 있다.

본 연구에서는 신경장애를 유발시키는 당뇨병에 의해 쥐뇌에서 gangliosides 대사과정이 어떻게 변화되는가를 관찰하고 신경계통의 기능 촉진과 탄수화물대사 기능개선에 효능이 있는 녹용(松浦, 1974)을 투여하여 혈당과 인슐린의 변화 및 gangliosides 대사과정을 관찰하여 녹용이 당뇨병에 미치는 영향을 조사하였다.

실험방법

실험재료 및 시약

HPTLC plate(silica gel 60)는 Merck 제품을 사용하였다. 표준물질로 사용한 소뇌 gangliosides 혼합물, GM3, GD3, N-Acetylneuraminic acid(sialic acid), 그리고 Streptozotocin은 Sigma 제품을 사용하였으며, 당뇨병의 진행정도를 확인하기 위하여 Boeringer Mannheim 제품의 glucotest stick을 이용하였다. Orcinol anhydrous는 BDH 제품을, 그리고 resorcinol은 Wako Pure Chemical Industries 제품을 사용하였다. ^{125}I -insulin RIA Kit는 INCS-TAR 제품을 사용하였다. 투석막(제한 분자량 1000)은 Spectrum 제품을 사용하였고 그밖의 실험에 사용된 시약은 시중에서 구입한 분석용 특급 내지 일급시약을 사용하였다. 쥐는 150~200 g 정도의 Sprague Dawley종 수컷으로 서울대학교 의과대학 동물실험실에서 공급받아 사용하였다.

당뇨병 쥐 유발과 혈당 정량

DNA alkylating agent인 streptozotocin을 쥐의 kg 체중당 60 mg을 꼬리 정맥에 주사하여 당뇨병을 유발시켰고 주사한 다음날부터 glucotest stick을 이용한 소변 검사로써 병의 유발을 확인하였다. 혈당은 쥐의 전혈에서 Somogy-Nelson방법(Plummer, 1978)으로 정량하였으며 510 nm에서 흡광을 측정하였다.

혈액에서 인슐린 측정

쥐의 전혈에서 분리한 혈장에 인슐린 이외의 물질을 제거하기 위하여 동량의 25% PEG(polyethylene glycol)을 첨가한 후 760×g에서 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취했다. 이 시료에 insulin antiserum을 가하여 일정량을 시료와 결합시키고 ^{125}I -insulin을 가하여 남은 insulin antiserum과 결합시켜 이때의 활성을 gamma scintillation counter로 측정하여 쥐전혈에 존재하는 인슐린을 정량하였다.

뇌에서 ganglioside 분리

당지질의 분리는 Folch 등(1957)-Suzuki(1965) 방법을 변형하여 수행하였다. 쥐에서 분리한 뇌를 4배 부피의 물로 파쇄한 후 chloroform/methanol(4 : 8, v/v) 혼합용액을 가하고 4시간 정도 실온에서 저어준 후 여과하였다.

잔여물에 chloroform/methanol(8 : 4, v/v)를 가하고 2시간 정도 실온에서 추출한 후 여과하여 처음의 여과액과 합하였다. chloroform/methanol의 최종비가 2 : 1(v/v)이 되도록 적당량의 chloroform을 가한 후 0.2배의 0.88% KCl수용액을 넣고 1시간 정도 추출한 후 분배시켰다. 이때 gangliosides는 윗층 수용액에 분배된다. 아래층을 다시한번 Theoretical Upper Phase(chloroform/methanol/0.88% KCl in water=3 : 48 : 47, v/v/v)로 씻어준 후 윗층을 취하여 합하였다. 윗층을 진공감압하에서 유기용매를 제거하고 농축시킨 후 불필요한 유리당이나 염을 제거하기 위하여 투석하였다. 투석시킨 시료를 동결건조하여 chloroform/methanol(1 : 1, v/v)에 녹여 보관하였다.

High Performance Thin Layer Chromatography(HP-TLC)

HPTLC판 (10×10 cm)을 활성화시켜 사용하였다. 두 종류의 전개용매를 사용하였으며 solvent system A는 n-propyl alcohol/0.1% CaCl_2 in water(80 : 20, v/v)이고 solvent system B는 chloroform/methanol/0.2% CaCl_2 in water(55 : 45 : 10, v/v/v)이다. 발색 시약으로는 orcinol-ferric chloride-sulfuric acid용액과 resorcinol-hydrochloric acid 용액을 사용하였다. 정확한 분석을 위해 2D-HPTLC를 수행하였다(Kazuya 등, 1993). 1차 전개용매로는 chloroform/methanol/12 mM $\text{MgCl}_2/\text{aq. NH}_3$ (50 : 40 : 7 : 3, v/v/v/v)와 2차원 전개용매로는 chloroform/methanol/12 mM MgCl_2 (5 : 4 : 1, v/v/v)를 사용하였다. 발색 시약으로는 resorcinol-hydrochloric acid를 사용하였다.

실험 결과

뇌에서 gangliosides 분석

Streptozotocin(STZ)으로 당뇨병을 유발시킨 후 쥐의 뇌 gangliosides를 분석한 결과가 Fig. 1이다. 당뇨병의 진행정도에 따라 gangliosides의 존재양상이 다르게 나타났다. 정상쥐(e열)에 비해 고혈당으로 인해 사망한 쥐의 경우(a, c열), GM1a(보통 GM1으로 표기)가 증가하였고 GD1a, GD1b, 그리고 GT1b는 합성되지 않았으며 미확인 ganglioside가 존재하였다. 그러나 혈당이 200 mg/dl 정도 이었던 당뇨병쥐(b, d열)는 정상과 유사한 양상을 보여 주었다. 이와 같은 현상은 당뇨병으로 인하여 gangliosides의 대사 과정이 변화되었음을 알 수 있었다. Gangliosides 합성 과정(Fig. 2)이 쥐 뇌에서 정상적으로 진행된다면(Fig. 1e), Fig. 2에서 보는 바와 같이 a 계열과 b 계열의 합성과정이 일어나 주로 GM1a, GD1a, GD1b와 GT1b가 존재하게 된다. 그러나 당뇨병이 진행됨에 따라(Fig. 1b, d) a 계열의 합성보다는 b 계열의 합성이 촉진되어 GD1a가 감소되며 GD1b와 GT1b가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 당뇨병이 심하게 진행되면(Fig. 1a, c)

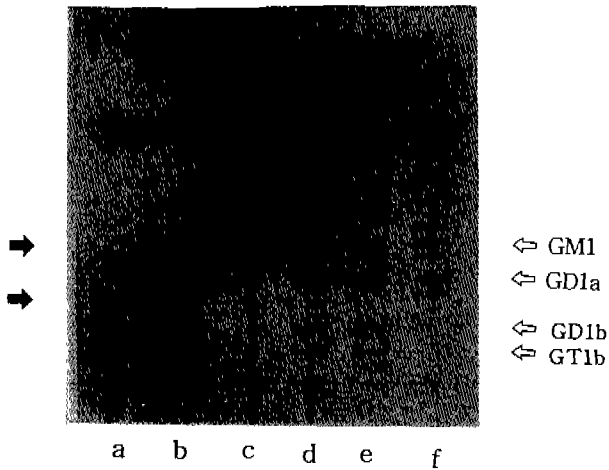


Fig. 1. High performance thin layer chromatogram of gangliosides in normal and diabetic rat brain. The HPTLC plate was developed with solvent system A and visualized by resorcinol-hydrochloric acid. 18mg of each brain was spotted. (a) which was died on 2nd day after STZ injection (b),(d) which was alive on 3rd day after STZ injection (c) which was died on 3rd day after STZ injection (e) normal rat (f) standard bovine brain gangliosides.

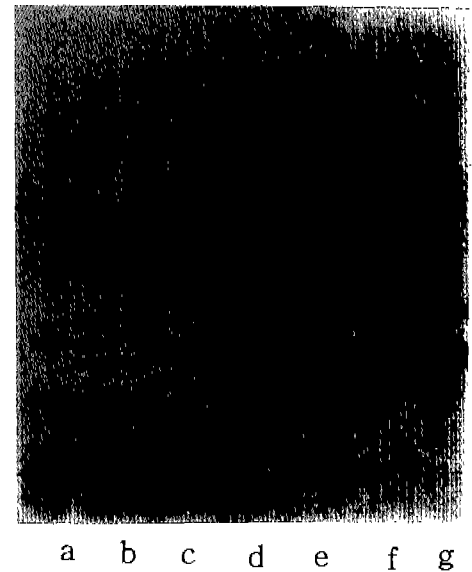


Fig. 3. High performance thin layer chromatogram of GM1 which is highly accumulated in diabetic rat brain. The HPTLC plate was developed with solvent system A and visualized by resorcinol-hydrochloric acid. (a) standard GM1 (b) standard GD3 (c),(d),(e),(f),(g) 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l, 10 μ l of GM1 band eluent of diabetic rat brain gangliosides.

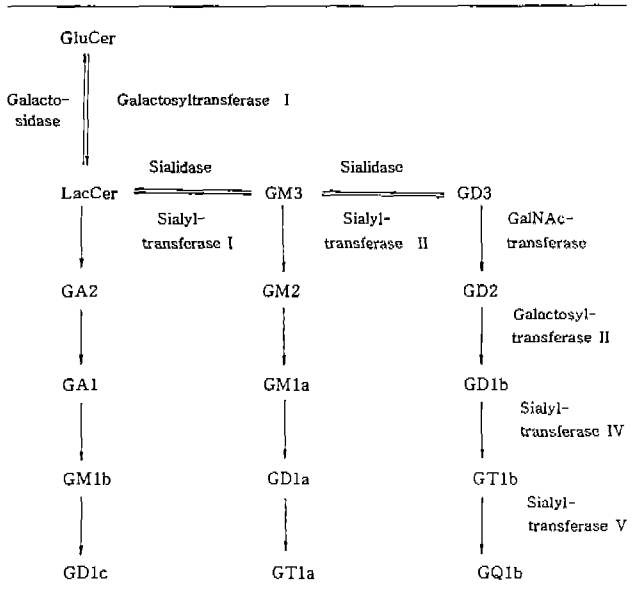


Fig. 2. General scheme for gangliosides biosynthesis.

b 계열의 합성도 억제되어 GM1a만이 다량 존재하였다. GM1a와 GD3는 HPTLC 상에서 분리되는 위치가 유사하므로 당뇨병쥐의 뇌에 존재하는 다량의 GM1a band에 GD3가 존재할 가능성이 있다. HPTLC에서 분리된 GM1 band만을 chloroform-methanol 용매로 추출하여 농도를 달리하며 분석한 결과가 Fig. 3이다. Fig. 3에서 보면 GM1a의 양이 많아져 band가 아래로 쳐진 것으로, GD3는 존재하지 않았다. 그러나 더 정확한 분석을 위하여 2D-HPTLC를 수행한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이, GD3

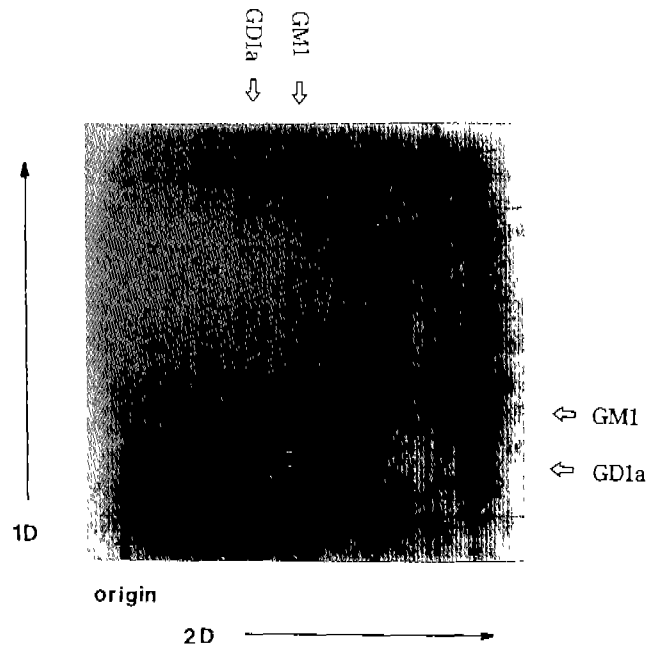


Fig. 4. 2-Dimensional high performance thin layer chromatogram of gangliosides in diabetic rat brain. Gangliosides were separated by 2-dimensional solvent system described under methods and visualized by resorcinol-hydrochloric acid.

가 소량 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 당뇨병으로 인해 쥐 뇌에서 gangliosides의 대사과정이 변화되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 alloxan과

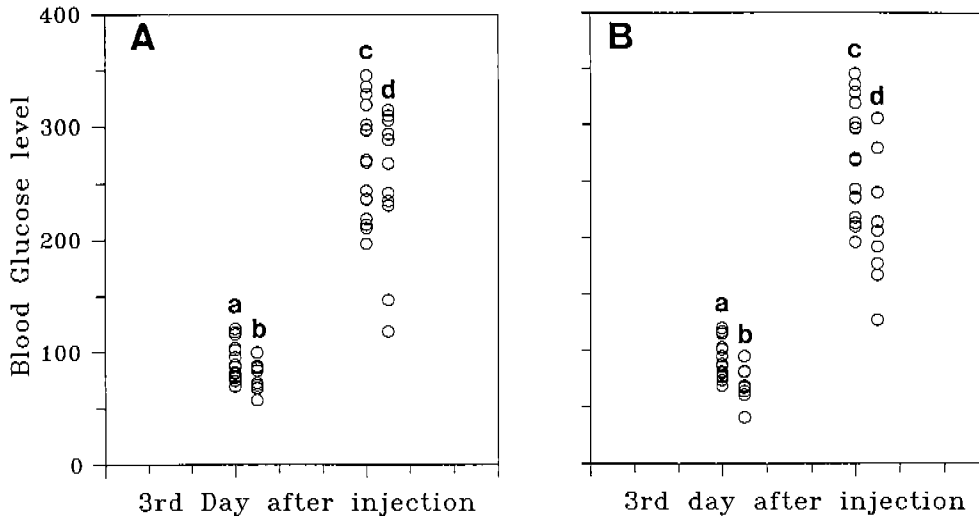


Fig. 5. The blood glucose level in 70% EtOH extract(A) and major peak fraction(B) eluted Bondapak C18 column of deer antler treated normal and diabetic rats. (a) normal rats (b) antler-treated rats (c) streptozotocin-treated rats (d) streptozotocin and antler-treated rats.

Table I. The blood glucose(BG) and insulin level in Deer Antler extract-treated normal and diabetic rats

Group	BG level	Insulin level
	(mg/dL)	(μ U/ml)
normal	89.40 \pm 16.2	8.33 \pm 0.31
diabetic*	540.5 \pm 45.3	2.20 \pm 0.10
deer antler treated		
normal	75.5 \pm 6.5	4.15 \pm 0.35
diabetic*	338.0 \pm 16.0	4.10 \pm 0.20

*We performed single injection of streptozotocin to make diabetes, tail i.v.. And then rats were sacrificed 3 days after streptozotocin administration. Data were shown as Mean S.D.

streptozotocin으로 유발시킨 당뇨병쥐의 간, 췌장, 비장에서 각각 gangliosides를 분석한 결과 정상외 것과 같았다(자료제시하지 않음).

녹용에 의한 효과

혈당 및 인슐린 분석 : Streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킬 때 한 등(1993)의 방법에 의해 분리한 녹용 추출물 100 μ l를 쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 그 효과를 관찰하였다(Fig. 5). 70% 에탄올 추출물과 주요지질 성분 모두 혈당을 감소시키는 효과가 있었다. 녹용의 70% 에탄올 추출물을 정상쥐에 투여했을 때 쥐의 체중이 급격히 증가하였으나 녹용의 주요지질성분을 주사한 경우 쥐의 체중에 영향을 주지 않았다(자료제시하지 않음). 쥐혈액에서 포도당과 인슐린을 정량하였다(Table I). 이 결과로, 투여한 녹용 추출물에 의해 정상쥐와 당뇨병쥐 모두 혈당이 감소하는 것을 관찰하였다. 따라서 당뇨병쥐에서 녹용에 의해 혈당이 감소하는 현상은 인슐린 분비와 관련이 적은 것으로 판단되었다.

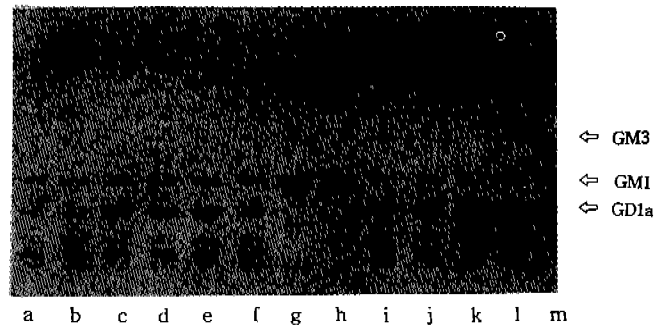


Fig. 6. High performance thin layer chromatogram of gangliosides in diabetic rat brain treated purified antler extract. The HPTLC plate was developed with solvent system A and visualized by resorcinol-hydrochloric acid. 18 mg of each brain was spotted. (a-f); normal rats, (g, h); diabetic rats, (i-l); antler-treated diabetic rats, (m); standard bovine brain gangliosides.

Gangliosides 분석 : 당뇨병 쥐의 뇌에 녹용의 주요지질성분이 미치는 효과를 조사하였다. 쥐뇌에서 gangliosides를 분리하여 HPTLC로 분석한 결과가 Fig. 6이다. 조직의 무게 18 mg에 해당하는 양을 점적한 결과, 당뇨병쥐에 녹용 추출액을 첨가한 경우(i, j, k, l 열) 당뇨병에 의해 변화된 gangliosides의 존재 양상(g, h 열)이 정상으로 돌아옴을 확인하였다. 그러나 소뇌의 gangliosides를 당뇨병쥐에 주사하였을 때(Fig. 7 h, i 열)는 쥐뇌에서 gangliosides의 대사과정이 당뇨병에 의해 변화된 그대로 유지되었다. 따라서 당뇨병 유발시 녹용추출물을 투여하였을 때 혈당이 감소하고 뇌에서 gangliosides의 대사과정이 정상으로 유지되는 것으로 보아 녹용이 당뇨병 진행에 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

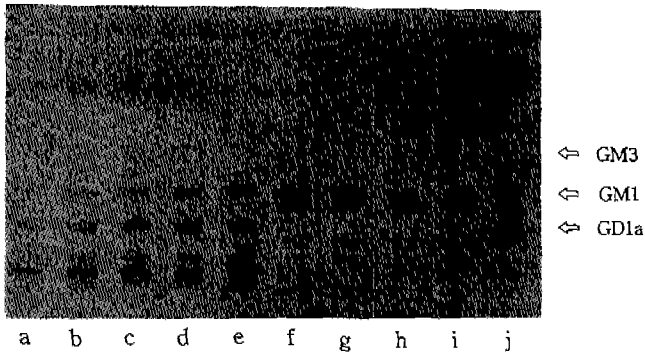


Fig. 7. High performance thin layer chromatogram of diabetic rat brain gangliosides treated bovine brain gangliosides (BBG). The HPTLC plate was developed with solvent system A and visualized by resorcinol-hydrochloric acid. 18mg of each brain was spotted. (a,b); normal rats, (c,d,e); BBG treated normal rats, (f,g); diabetic rats, (h,i); BBG treated diabetic rats, (j); standard bovine brain gangliosides.

고 찰

당뇨병을 유발시키는 약물의 종류에 따라 쥐 뇌의 gangliosides 존재 양상이 달라지는 것을 관찰하였다. Alloxan으로 당뇨병을 유발시켰을 때는 쥐 뇌에서 GM1보다 R_f값이 큰 gangliosides가 증가하였으나 GD1a, GD1b, 그리고 GT1b의 양에는 변화가 없음을 이미 관찰한 바 있다(박과 전, 1993). 본 연구에서는 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 결과 GM1a의 양이 크게 증가하였고 GD1a, GD1b, GT1b는 존재하지 않았으며 미확인 ganglioside가 합성되었다. 현재의 연구결과로도 당뇨병에 의해 쥐 뇌에서 gangliosides의 합성과정은 변화되는 것을 관찰할 수 있었으나 미확인 ganglioside의 구조를 규명하게 되면 더욱 확실한 대사경로를 제시할 수 있을 것이다.

녹용의 효능에는 신경계통의 기능 촉진, 자율신경 및 정신장애 개선 및 탄수화물대사의 기능장애를 개선시킨다는 보고가 있다(松浦, 1974). 당뇨병에 녹용이 어떠한 효과가 있는가를 조사한 결과 혈당을 감소시키고 뇌에서 gangliosides의 대사과정을 정상으로 변화시키는 것을 관찰하였다. 70% 에탄올 추출물과 주요 지질성분 모두 효과가 있었으나 주요 지질성분이 더 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 녹용의 주요 지질성분의 구조는 일부 규명되었으며 polyunsaturated fatty acid로 추정하고 있다(한 등, 1933)

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 핵심연구비(921-0300-022-2)와 1993년도 보건사회부 신약개발연구지원에 의해 이루어졌으며 이에 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- 박은정, 전길자 (1993). 당뇨병쥐 뇌에서 Gangliosides 분석. 한국생화학회지. **26**, 540-546.
- 松浦 上 (1974). 内科領域における不定愁訴症候群におけるハントクリン注の使用 經驗. 現代の診. 16卷 155-158.
- 한나영, 전길자 (1992). 녹용에서 당함유성분의 분리 및 분석. 한국생화학회지. **25**, 444-451.
- 한나영, 유경임, 전길자 (1993). 녹용의 지질성분의 구조분석. 한국생활과학연구원 논총. **52**, 101-108.
- Arief, A. I. and Kleeman, C. R. (1973). Studies on mechanisms of cerebral edema in diabetic comas. *J. Clin. Invest.* **52**, 571-583.
- Benech, C., Sotelo, Jr., Martinez, R. and Correa-Luna (1990). Effects of gangliosides on the methionine uptake in crushed sciatic nerves of rats with alloxan diabetes. *Neuroscience Letters* **114**, 220-224.
- Bremer, E., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. F., Raines, E. and Ross, R. (1984). Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem* **259**, 6818-6825.
- Chan, K. J. (1987). Ganglioside-modulated protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **262**, 5248-5255.
- Cherkin, A. and Flood, J. F. (1985). Our Hecthy Care Density. pp 169-183 Springer-Verlag, New York.
- Daniotti, J. L., Landa, C. A., Rosner, H. and Maccioni, H. J. (1992). Adult rat retina interneurons synthesize GD3: GD3 expression by these cells is regulated by cell-cell interactions. *J. Neurochem.* **59**, 107-117.
- Folch-Pi, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol Chem.* **226**, 497-509.
- Grunnet, M. L. (1963). Cerebrovascular disease: Diabetes and cerebral atherosclerosis. *Neurology* **13**, 486-491.
- Hilbush, B. S. and Levine, J. M. (1991). Stimulation of a Ca²⁺-dependent protein kinase by GM1 ganglioside in nerve growth factor-treated PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 5616-5620.
- Kazuya, I. P., Jwa, H., Fumitoshi, I., Minori, S., Kazuo, K., Susumi, A. and Yoshio H. (1993). A novel ganglioside with a free amino group in bovine brain. *Biochem. J.* **296**, 259-263.
- Nojiri, H., Takaku, F., Terur, Y., Miura, Y. and Saito, M. (1986). Ganglioside GM3: An acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytic leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 782-786.
- Plummer, D. T. (1978). *Introduction to practical Biochemistry* rd ed. pp 184-185.
- Saqr, H. E., Pearl, D. K. and Yates, A. J. (1993). A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. *J. Neurochem.* **61**, 395-411.
- Suzuki, K. (1965). The pattern of mammalian brain ganglioside-II: Evaluation of the extraction procedures, post-mortem changes and the effects of formalin preservation. *J. Neurochem.* **12**, 629-638.

Webb, W. and Mohan, G. (1981). Electrolyte and fluid imbalance: Neuropsychiatric manifestations. *Psychosomatics* **22**, 199-203.

Yates, A.J., VanBrocklyn, J., Saqr, H. E., Guan, Z., Stokes, B. T. and O'Dorisio, M. S. (1993). Mechanisms through

which gangliosides inhibit PDGF-stimulated mitogenesis in intact Swiss 3T3 cells: Receptor tyrosine phosphorylation, intracellular calcium, and receptor binding. *Exp. Cell Res.* **204**, 38-45.