

Streptozotocin유발 당뇨쥐에 있어서 Metallothionein 합성에 미치는 비타민 E의 영향

최원경 · 이순재[†]

대구효성카톨릭대학교 식품영양학과

Effects of Vitamin E on the Metallothionein Synthesis in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Won-Kyung Choe and Soon-Jae Rhee[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Daegu Hyosung Catholic University, Kyungsan 713-702, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of vitamin E on the synthesis of the metallothionein in the liver of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats (220 ± 10 mg) were randomly assigned to one control and three STZ-diabetic groups. Diabetic groups were classified to STZ-0E (vitamin E free diet), STZ-40E (40mg vitamin E/kg of diet) and STZ-400E (400mg vitamin E/kg of diet) according to the level of vitamin E supplementation. Blood glucose levels of STZ-diabetic rats were three times higher than that of control. The contents of vitamin E in liver were lower significantly STZ-0E, STZ-40E groups by 50%, 36% compared with that of control. Lipid peroxide values (LPO) in liver were higher 5.6 and 2.5 times in STZ-0E and STZ-40E groups than that of control. Plasma cortisol levels were higher STZ-0E and STZ-40E groups compared with those of control, but cortisol levels were lower significantly in STZ-400E group compared with those of the STZ-0E and the STZ-40E groups. The plasma insulin levels were lower in all three STZ-diabetic group compared with that of control, but were not affected by the level of dietary vitamin E. The metallothionein (MT) contents in liver, kidney and small intestine were five times higher in STZ-0E, STZ-40E and STZ-400E compared with that of control, but STZ-400E group was lower in the MT contents in tissues compared with that of STZ-40E group. Zn-MT peak in STZ-diabetic rats liver increased than that of control by Sephadex G-75, and Zn-MT peak divided into MTI and MTII peaks by DEAE Sephadex A-25 column chromatography. The present results indicate that STZ-induced diabetic rats are more sensitive to oxidative stress, leading to the acceleration of lipid peroxidation process, which can be more promoted low level of dietary vitamin E. And the result may that increase synthesis of MT induced in the liver of diabetic rats increased so it can be sure that the diabetes is one of the MT induce factor by free radical generation. And high vitamin E supplementation reduced total MT contents of liver, kidney and small intestine and the peak of purified Zn-MT. Through the results of these experiments, we can conclude that MT might be the free radical scavenger.

Key words : diabetic rat, metallothionein, free radical, vitamin E

서 론

Metallothionein(MT)는 Margoshes와 Vallee¹⁾에 의하여 신장 피질로부터 처음으로 분리되었고 여러 동물의

간조직과 신장조직에서 발견되었다^{2,3)}. 이 MT는 cytoplasm에 존재하는 저분자량의 cystein이 풍부한 금속결합단백질 (metal binding protein)^{4,5)}이며, 이미 밝혀진 MT의 생물학적인 기능은 중금속의 해독 및 저장^{6,7)}, 그리고 생체내 생리적 변화에 따라 미량금속 (trace metal) 대사와 관련이 있으며⁸⁻¹⁰⁾, UV 또는 X-ray로 인한 손상을 막아주며¹¹⁾, 최근에는 free radical을 scavenging한다

[†]To whom all correspondence should be addressed

¹⁾ 이 연구는 1993년도 한국과학재단 연구비 지원(과제 번호 : 931-0600-045-2)에 의한 결과의 일부임.

는 가설¹¹⁻¹³⁾이 있지만 확실치 않다. 또한 MT합성을 유도하는 인자로서는 Cd, Hg, Zn, Cu와 같은 중금속¹⁴⁾, glucocorticoid¹⁴⁻¹⁵⁾, glucagon¹⁶⁾, epinephrine¹⁷⁾과 같은 호르몬, cAMP, interferon, interleukin I¹⁸⁾, 식이제한(food restriction)¹⁹⁾, 육체적 속박(physical immobilization)²⁰⁾, 염증인자(inflammatory agent)²⁰⁾ 등을 들 수가 있는데 이러한 인자들 중에는 free radical inducer로서 체내의 과산화적 손상을 초래하는 것도 있다. 그러므로, free radical 제거물질 역할로서 가능성이 있는 MT는 생체내 환경을 조절해주는 조절자로서의 역할을 한다고 할 수 있겠다.

지금까지 MT의 free radical 제거 역할에 대한 연구로는 Hidalgo 등²¹⁾이 쥐에게 free radical inducer로 알려져 있는 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 투여하였을 때나 육체적 속박상태를 만들었을 때 그리고 단식(starvation)을 시켰을 때 간의 지질과산화물의 증가와 함께 MT가 현저하게 증가되었다는 보고가 있고, Zn-MT는 xanthine oxidase에 의해 생성된 hydroxyl radical(OH⁻), superoxide radical(O₂⁻)을 제거한다는 Thomas 등¹²⁾의 보고도 있다. 이들을 뒷받침하는 연구로는 Thonally와 Uasak¹¹⁾이 MT는 방사능조사에 의해 유도된 free radical을 제거하여 산화적 스트레스에 대해 방어한다는 가능성을 제시한 바 있다. 또한 여러 산화적 스트레스 상태에서 비타민 E와 C를 투여함으로써 MT가 감소한 결과를 통해 MT 및 지질과산화는 서로 상관이 있다는 보고도 있다¹³⁾.

당뇨병에서는 insulin과 glucagon level에 변화가 일어나고 adrenal steroid secretion 조절이 정상적으로 되지 못하여 glucocorticoid level의 증가 등 hormonal imbalance를 초래하며²¹⁾, free radical의 반응으로 지질과산화가 진행된다는 여러 연구 결과와 free radical의 유도로 인해 MT합성이 증가된다는 Hidalgo 등¹³⁾의 결과들 사이에 관련이 있다고 볼 수 있다.

당뇨병 쥐에서는 산화적 stress에 대한 감수성이 높아 지질과산화가 쉽게 일어난다는 보고²²⁾와 또 이러한 산화적 stress에 의해 glucocorticoid 호르몬이 증가되고²³⁾ 또 한편으로 glucocorticoid가 MT 합성을 촉진시킬 수 있다는 보고 및 당뇨병 쥐에서 zinc, copper흡수가 촉진되어 MT 함량이 증가된다는 보고들^{24,25)}을 미루어 보아 이때 합성된 MT는 free radical 제거자로서의 역할이 가능하다는 이론을 뒷받침할 수 있다고 가정할 수 있다. 이와 같은 점에서 산화적 stress에 민감한 당뇨병에 있어서, 첫째 free radical에 의한 지질과산화와 이에 따른 과산화적 손상정도를 파악하고, 둘째 이를 최대한 방어할 수 있는 항산화기구를 강화시키는

것과 MT에 대한 항산화적 역할을 확인하기 위해, 세제 호르몬 불균형이 zinc와 copper 대사에 변화를 가져와 MT합성을 초래한다는 가설을 확인하기 위해 강력한 항산화제인 비타민 E와 함께 당뇨병에서의 MT가 연구되어야 한다고 생각된다. 그러나 이것과 관련하여 당뇨병에 있어서 과산화적 손상과 항산화적 방어기구 및 MT합성의 양상에 대한 종합적인 연구와 이에 미치는 항산화제의 영향에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

그러므로, 본 연구에서는 비타민 E 수준을 달리한 식이로 일정기간 사육한 후 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시켜 간장조직의 과산화적 손상 정도를 측정하고, 각 조직 중의 MT 함량 변화와 호르몬을 측정하여 호르몬 불균형으로 인한 MT 합성의 가능성도 확인하고자 하였고, 식이내 비타민 E 수준을 달리하여 투여했을 때 체내 MT 함량 변화를 관찰하였다. 아울러 MT의 특성을 관찰하기 위하여 gel filtration과 anion exchange chromatography를 이용하여 당뇨병상태일 때 Zn-MT, Cu-MT의 변화와 Zn-MTI, Zn-MTII를 분리정제하여 상기 조건에서 조직내 MT의 pattern변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육

실험동물은 체중 220g 내외의 Sprague-Dawley종 숫컷을 대전 화학연구소에서 구입하여 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반배합사료(제일사료 주식회사)로 일주일간 예비사육한 후 난립법(randomized complete block design)에 의해 Table 1과 같이 대조군과 실험군으로 나누는 후 실험군을 다시 식이내에 비타민 E를 급여하지 않은 군(STZ-0E), 비타민 E를 정상수준으로(40mg/kg diet) 급여한 군(STZ-40E), 비타민 E를 다량 급여한 군(400mg/kg diet) 투여한 군(STZ-400E) 등 각 10마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 기본 실험 식이조성은 Table 2와 같다.

Table 1. Classification of experimental groups

Group	Vitamin E	
	(mg/kg diet)	
		STZ injection
Control	40	-
STZ*-0E	0	+
STZ*-40E	40	+
STZ*-400E	400	+

*Intravenous injection of streptozotocin (55mg/kg BW) in citrate buffer (pH 4.3) via tail vein

Table 2. Composition of basal diet

Ingredients	Basal diet (g/kg diet)
Corn starch ¹⁾	668
Casein ²⁾	180
DL-Methionine ³⁾	2
Corn oil ⁴⁾	50
Salt mix. ⁵⁾	40
Vitamin mix. ⁶⁾	10
Cellulose ⁷⁾	50
kcal/kg	3850

¹⁾ Pung Jin Chem. Co.

²⁾ Lactic casein, 30 mesh, New Zealand Daily Board, Wington, N.Z.

³⁾ Sigma chem. Co.

⁴⁾ Dong Bang Oil Co.

⁵⁾ Salt mix. : according to Haper's⁴⁰⁾

g per/100g of salt mixture ; CaCO₃, 30.0g ; CaHPO₄, 7.5g ; K₂HPO₄, 32.2g ; NaCl, 16.7g ; MgSO₄ · 7H₂O, 10.2g ; ferric citrate, 2.75g ; MnSO₄, 0.51g ; KI, 70mg ; CuCl₂ · 5H₂O, 35 mg ; ZnCl₂, 25mg ; CoCl₂ · 5H₂O, 5mg ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O, 5mg

⁶⁾ Vitamin E free mix. :

per kg of diet ; thiamin-HCl, 20mg ; riboflavin, 21mg ; pyridoxine, 20mg ; nicotinic acid, 90mg ; d-calcium pantothenate, 60mg ; folic acid, 10mg ; biotin, 1mg ; menadione, 45mg ; vitamin B₁₂ (0.1% triturate in mannitol), 20mg ; retinyl acetate, 2,000IU ; cholecalciferol, 1,000IU ; choline, 1.5g ; inositol, 0.1g ; vitamin C, 0.9g ; p-amino benzoic acid, 0.1g

⁷⁾ Sigma Chem.Co.

CMC (Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

당뇨 유발

실험동물을 희생하기 4일 전에 streptozotocin (STZ, 55mg/kg B.W.)을 신선한 citrate buffer (pH 4.3)에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사한 후 18시간이 지나면 hyperglycemia 상태가 되므로 정상적으로 사육한 쥐를 STZ를 주사한 후 4일째를 기준으로 300mg/dl 이상인 동물만 사용하였다.

식이섭취량, 체중증가량 및 식이 효율

식이와 식수섭취량 및 체중은 전 실험기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 전 체중증가량을 같은 기간 동안의 식이섭취량으로 나누어 줌으로써 계산하였다.

혈액 및 장기채취

실험 종료 후 실험동물을 ether 마취하에서 복부대동맥으로 채혈하여 heparin으로 처리한 혈액의 일정량과 heparin으로 처리하지 않은 혈액을 각각 따로 취하여 실온에서 30분간 방치한 후 1500g에서 각각 15분간씩

원심 분리하여 혈청과 혈장을 얻었다. 혈청은 glucose 측정용으로, 혈장은 insulin, cortisol 측정용으로 각각 사용하였다. 그리고 간장, 신장 및 소장은 적출하여 생리식염수로 씻어내고 무게를 측정한 후 액체질소로 급동결시켜 -80°C에 보관하였다.

혈장 insulin and cortisol 함량 측정

Plasma insulin은 Radioimmunoassay법²⁶⁾에 따라 Insulin RIABEAD II Kit (Abbott)를 사용하여 측정하였다.

Plasma cortisol은 Radioimmunoassay법²⁷⁾에 따라 Amersham Cortisol RIA Kit (Amersham)를 사용하여 함량을 측정하였다.

간조직중의 vitamin E 함량 및 과산화지질 (Lipid peroxide ; LPO) 측정

간조직 중의 vitamin E 측정은 간조직마쇄액 1.0ml를 Kayden 등²⁸⁾의 방법에 따라 hexane으로 추출하여 30°C에서 질소가스로 건조시킨 후 이것을 시료로 하여 ferric-chloride dipyritydyl법²⁹⁾에 의해 측정하였다. LPO정량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satoh 방법³⁰⁾을 이용하였다. 단백질은 Biuret법³¹⁾과 Lowry법³²⁾을 이용하여 정량하였다.

간장, 신장 및 소장조직의 total metallothionein 함량 측정

간장, 신장 및 소장조직의 일정량을 취하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 10mM tris/HCl (pH 8.2), 0.25M sucrose, 2mM 2-mercaptoethanol, 10mM sodium azide, 0.1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)의 50%용액으로써 마쇄하여 105,000g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 cytosol에서 Hidalgo 등³³⁾의 방법에 의하여 total MT를 측정하였다.

MT의 정제

시료 전처리

일정량의 간조직을 취하여 2배 양의 10mM tris/acetate buffer (pH 7.4)를 사용하여 Potter-Elvehjem homogenizer로 마쇄한 다음 100,000g에 60분 동안 초원심하여 얻은 cytosol을 100°C에 2분간 가열한 다음 다시 microfuge에 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 gel filtration을 위한 시료로 사용하였다.

Sephadex G-75 gel filtration²⁵⁾

Sephadex G-75 column의 평형화는 10mM tris/acet-

ate buffer (pH 7.4)를 사용하였고 column의 크기는 2.5 × 60cm이다. 분획량은 5ml, 시간당 유속은 17ml의 속도로 순차적으로 용출시켰으며 각분획의 metal 함량은 atomic absorption spectrophotometer를 사용하여 측정하여 peak부분을 모아서 DEAE A-25 column chromatography를 위한 시료로 사용하였다.

DEAE Sephadex A-25 column chromatography²⁶⁾

DEAE A-25 column의 평형화는 10mM tris/acetate buffer (pH 7.4)로 하였고 column의 크기는 1.5 × 30cm로 하였다. 시료 단백질을 흡착시킨 뒤 흡착 단백질 부분을 10mM tris/acetate (pH 7.4)와 100mM tris/acetate (pH 8.6) 그리고 100mM tris/acetate (pH 8.6)와 200mM tris/acetate (pH 8.6)의 linear gradient로 분획량 5ml, 시간당 유속은 30ml의 속도로 순차적으로 용출시켰으며, 각 분획의 metal 함량은 atomic absorption spectrophotometer를 사용하여 측정하여 MTI, MTII peak부분을 각각 모아서 전기영동 시료로 사용하였다.

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis^{34, 35)}

DEAE A-25 column chromatography에 의해 분리된 MT시료를 carboxymethylation시켰다. 즉 MT시료를 각각 YC membrane filter (Amicon Co., Danvers, MA)를 사용하여 농축한 다음 그것을 시료로 하여 10mM tris (pH 8.0), 10mM DTT, 2mM PMSF로 만든 buffer solution과 0.2M DTT, 0.2M EDTA을 넣고 5분간 가열한 다음 신선한 iodoacetate를 넣어 50°C에서 20분간 항온시킨 뒤

다시 냉각시켜 전기영동하였다.

전기영동 전개용매는 SDS-tris-glycine buffer (tris 0.25M, glycine 1.92M, SDS 0.1M pH 8.3)를 사용하였으며 Laemmli의 방법³²⁾에 따라 SDS-15% PAGE acrylamide를 사용하였고 bromophenol blue (BPB)를 tracking dye로 하여 50mA 전류에서 4시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 coomassie brilliant blue R-250으로 12시간 염색하였으며 그 후에 10% acetic acid와 7% methanol이 함유한 탈색용액으로 12시간 이상 탈색하였다.

통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균 차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석 (ANOVA검증)을 수행하였으며, 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

체중증가, 간장의 무게, 식이 섭취량 및 식이효율

실험 4주간 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 전실험기간 동안 체중변화를 관찰한 결과 (Table 3, Fig. 1) streptozotocin (STZ)을 투여하기 전까지는 대조군에 비해 STZ-0E군만 낮았으나 STZ을 투여한 후에는 STZ 투여군들은 모두 현저하게 감소하였다. 실험군간의 체중감소량을 비교해 보면

Table 3. Body weight increase, liver weight, food intake and feed efficiency rate (FER) of experimental rats

	Body weight increase (g/4wks)	Food intake (g/4wks)	FER	Liver weight (g)
Before STZ injection				
Control	120.0 ± 10.21 ^a	322.73 ± 14.15 ^{NS}	0.372 ± 0.045 ^a	
STZ-0E	85.0 ± 7.14 ^b	369.75 ± 17.25	0.230 ± 0.032 ^b	
STZ-40E	115.0 ± 9.52 ^a	306.01 ± 22.60	0.376 ± 0.043 ^a	
STZ-400E	100.0 ± 6.17 ^b	330.81 ± 19.35	0.302 ± 0.039 ^{ab}	
After STZ injection				
Control	20.0 ± 1.15 ^a	80.82 ± 14.35 ^a	0.248 ± 0.018 ^a	11.25 ± 0.94 ^a
STZ-0E	-50.0 ± 4.37 ^b	38.35 ± 1.65 ^b	-1.304 ± -0.123 ^b	5.41 ± 0.25 ^c
STZ-40E	-65.0 ± 5.24 ^b	71.46 ± 9.70 ^a	-0.910 ± -0.088 ^c	8.57 ± 0.47 ^b
STZ-400E	-35.0 ± 2.10 ^c	72.30 ± 5.45 ^a	-0.484 ± -0.050 ^c	8.68 ± 0.71 ^{ab}

All values are mean ± SE (n=10)

Values within a column with different superscript letters are significantly different each other groups at p < 0.05 by Tukey's test
NS : Not significant

Experimental and control groups were injected with or without 55mg STZ/kg B.W via tail vein

STZ-0E group : STZ injection after vitamin E free diet

STZ-40E group : STZ injection after vitamin E supplementation (40mg/kg diet)

STZ-400E group : STZ injection after vitamin E supplementation (400mg/kg diet)

STZ-400E군이 STZ-0E, STZ-40E군에 비해 STZ을 투여 한 후 감소율이 낮았다.

식이섭취량은 STZ 투여 전에는 대조군과 각 실험군 간에 차이가 없었으나 STZ 투여 후에는 대조군에 비해 STZ-0E군에서 감소하였다. 따라서 식이효율도 STZ 투여 전에는 STZ-0E군에서만 낮았으나 STZ 투여 후에는 대조군에 비해 모든 당뇨병군이 현저하게 감소하였으며 그 중에서도 STZ-0E군이 가장 낮았다. 간장의 무게는 대조군에 비해 STZ-40E군과 STZ-0E군이 감소되었는데 STZ-0E군이 가장 많이 감소되었으며 STZ-400E군은 차이가 없었다.

Blood glucose 함량

당뇨유발과 그 정도를 관찰하기 위하여 희생하기 전 6시간 절식시킨 후 혈당량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 모든 당뇨병유발 실험군이 대조군에 비해 약 3 배 정도 혈당량이 높았으며, 당뇨병유발 실험군 간에는 STZ-400E군이 STZ-0E군에 비해 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이가 없었다.

당뇨유발 정도를 관찰하기 위하여 혈청 중 glucose 함량을 측정한 결과 대조군에 비해서 당뇨병 유발군에

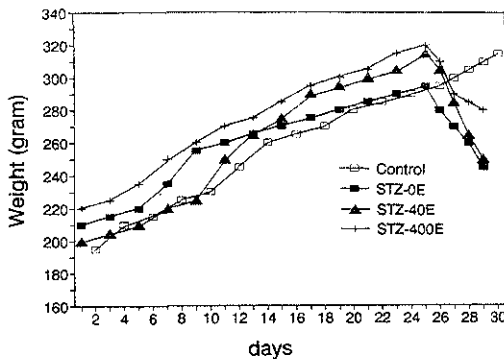


Fig. 1. Changes of body weight in rats during 4 weeks of experimental diet.

Table 4. Effect of dietary vitamin E on blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats

Groups	Blood glucose
	(mg/dl)
Control	133.91 ± 4.70 ^a
STZ-0E	445.25 ± 29.39 ^b
STZ-40E	443.72 ± 37.60 ^b
STZ-400E	421.06 ± 9.35 ^b

All values are mean ± SE (n=8)
Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

서 모두 심한 고혈당현상이 초래되는데, 이는 STZ이 췌장소도의 β세포를 손상함으로써 insulin 분비가 감소되고 따라서 당질 및 기타 대사이상으로 인해 고혈당이 발생 하는 것으로 알려져 있다³⁶. 그러나 비타민 E 투여의 영향은 관찰되지 않았는데, 이는 STZ에 의해 유발한 당뇨병 쥐에서 비타민 E는 insulin 함량과 glucose 함량에 영향을 미치지 않았다는 여러 연구 결과와 일치하였다³⁷.

간조직중의 과산화지질 함량과 vitamin E 함량

생체조직의 과산화적 손상의 지표로 알려져 있는 지질과산화가 (lipid peroxide ; LPO)를 측정 한 결과는 대조군에 비해 STZ-40E군은 2.3배 높았고 비타민 E가 부족한 STZ-0E군은 대조군에 비해 5.6배나 높았다. 그러나 비타민 E를 다량 투여한 STZ-400E에서는 대조군과 비슷한 수준이었다.

간조직 중의 비타민 E 함량은 대조군에 비해 STZ-0E 및 STZ-40E군은 각각 50%, 36%씩 감소되었다. 그러나 STZ-400E군은 대조군 보다 다소 낮았지만 유의적인 차이는 없었다.

이와같이 STZ-유발 당뇨병군에서 지질과산화값이 현저하게 증가되는 것은 생체막 지질에서 PLA₂의 활성화 증가로 arachidonic acid 함량이 증가되고 따라서 lipooxygenase와 cyclooxygenase system이 항진되어 free radical 생성이 증가된 것³⁸에 기인한다고 생각된다. 식이비타민 E 함유량에 따라 LPO값이 현저하게 감소된 것은 비타민 E는 arachidonate 대사가 항진되는 것을 제어하여 lipooxygenase와 cyclooxygenase의 활성을 감소시켜 free radical의 생성을 억제시키고 동시에 비타민 E의 chain-breaking antioxidant역할에 기인된 것이라 본다^{38,39}. 이런 결과는 Prichard 등³⁷이 STZ로써 당뇨병을 유발한 쥐에게 비타민 E를 투여한 후 혈장과 간조직의 지질과산화물 측정이 감소된 결과와 일치하였다. 그리고 간조직 중의 비타민 E 함량이 당뇨병유발군에서

Table 5. Effect of vitamin E on liver lipid peroxide value in STZ-induced diabetic rats

Groups	LPO	Vitamin E
	(MDA nmol/mg protein)	(µg/mg protein)
Control	1.49 ± 0.18 ^a	5.64 ± 0.42 ^a
STZ-0E	8.37 ± 1.68 ^b	2.81 ± 0.23 ^b
STZ-40E	3.35 ± 0.48 ^c	3.62 ± 0.18 ^c
STZ-400E	1.80 ± 0.15 ^a	4.89 ± 0.28 ^a

All values are mean ± SE (n=8)
Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

식이 중 비타민 E 공급수준에 비례해서 역시 감소하였으나 비타민 E를 다량 투여한 군은 대조군 수준으로 유지되었다. Behrens와 Madere⁴⁰⁾가 STZ으로 유발한 당뇨병 쥐의 조직에서 비타민 E와 C의 수준이 감소하였고 비타민 E와 C를 공급해줌으로써 조직 중 함량이 증가되었다고 보고한 결과와 일치하였다. 이는 당뇨병 유발로 free radical이 증가되고 이로 인해 조직의 과산화적 손상이 진행 됨에 따라 조직 속에 존재하고 있는 비타민 E가 생체내의 이러한 과산화적 병리적인 대사에 항산화제로서 사용되어 감소된 것이라고 추정된다.

혈장 insulin과 cortisol 수준

혈장 insulin과 cortisol 함량을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 혈장 insulin은 대조군에 비해 당뇨병 유발군 모두 31, 23, 31%씩 각각 감소하였으며, 당뇨병 유발군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

혈장 cortisol은 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E군은 약 50%, STZ-400E군은 17% 정도 증가하였으며, STZ-400E군은 STZ-0E, STZ-40E군에 비해 약 22% 정도 감소하여 대조군 수준 이었다.

당뇨쥐에서는 췌장소도의 β 세포의 손상으로 혈장 insulin의 분비가 감소하고 adrenal 호르몬 분비상태가 비정상인 된다는 Failla와 Kiser⁴⁵⁾의 보고와 일치하였고, 당뇨쥐에서는 adrenal hypertrophy에 의해 혈장 corticosterone level이 증가한다는 Nicola 등⁴¹⁾의 보고와도 일치하였다.

간장, 신장 및 소장중의 metallothionein 함량

STZ로 유도된 당뇨쥐에 있어서 간장, 신장 그리고 소장조직에서의 metallothionein 함량에 대한 측정 결과는 Table 7와 같다.

간장에서의 metallothionein 함량은 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E, STZ-400E군은 각각 5.6, 5.3, 3.3배씩 증가하였다. 당뇨유발 실험군간의 차이를 비교해

Table 6. Effect of dietary vitamin E on plasma cortisol and insulin levels in STZ-induced diabetic rats

Groups	insulin (μ U/ml)	Cortisol (μ g/100ml)
Control	21.47 \pm 0.86 ^a	1.02 \pm 0.14 ^a
STZ-0E	14.90 \pm 0.96 ^b	1.53 \pm 0.08 ^b
STZ-40E	16.58 \pm 0.62 ^b	1.57 \pm 0.11 ^b
STZ-400E	14.88 \pm 1.61 ^b	1.19 \pm 0.23 ^a

All values are mean \pm SE (n=8)

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test

보면 STZ-400E군은 STZ-0E, STZ-40E군에 비해 그 함량이 각각 40, 37%씩 낮았다.

신장에서의 MT 함량은 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E, STZ-400E군이 각각 약 2.9, 2.8, 2.2배수로 증가되었고, STZ-400E군은 STZ-40E군과 STZ-0E군에 비해 신장의 MT 함량이 20.5, 24.4%씩 감소되었다. 이와같이 간장이나 신장조직의 MT 함량은 비타민 E 투여량이 많을수록 감소되는 경향을 보였다.

소장에서의 MT 함량은 간조직과 신장조직에서와 마찬가지로 대조군에 비해 당뇨병 유발군 모두가 현저하게 증가되었고 당뇨병 유발 실험군간을 비교해 보면 STZ-40E군에 비해 STZ-400E군은 32.2% 감소되었고 STZ-0E군은 약간 증가하는 경향은 있었으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 STZ-0E군은 STZ-400E군에 비해 56.7% 증가하였다.

당뇨쥐의 간장에서 MT합성이 증가되고 비타민 E 다량 투여군 (STZ-400E)에서는 비타민 E 결핍군 (STZ-0E) 보다 감소되었는데, STZ 유발 당뇨쥐의 간과 신장조직에서 zinc, copper binding MT 함량이 증가한다는 최근의 몇몇 보고^{42,43)}들도 있듯이 MT합성이 지질과산화와 관련이 있다고 볼 수 있다. 즉, 당뇨상태에서는 cytosolic Zn-MT level이 증가되는데 이것은 두가지 기전으로 생각할 수가 있다. 첫째는 당뇨유발로 인한 호르몬의 불균형 상태에서 오는 MT합성 증가이고 둘째는 당뇨유발로 생성된 free radical을 제거하는 항산화역활로서의 합성 증가의 가능성이다.

Thiols은 H_2O_2 , O_2^- radical의 잘 알려진 제거자이다. Thomas 등⁴⁴⁾에 의하면 oxygen radical initiators의 물질로서 xanthine과 xanthine oxidase를 처리했을 때 MT의 초기방어는 Zn-MT의 thiolate group이 산화되어 metal 이온이 유리되고 이것이 세포막에 이용 (uptake)되어 XOD에 Fe(III)이 결합되는 redox cycling을 방해함으로써 지질과산화의 진행을 저해한다고 하였고, 또한 Zn-

Table 7. Effect of dietary vitamin E on liver, kidney and small intestine metallothionein levels in STZ-induced diabetic rats

	(μ g MT/g of wet tissue)		
	Liver	Kidney	Small intestine
Control	7.15 \pm 0.40 ^a	8.76 \pm 0.55 ^a	1.67 \pm 0.17 ^a
STZ-0E	40.00 \pm 6.49 ^b	25.54 \pm 1.52 ^b	28.34 \pm 2.28 ^b
STZ-40E	38.09 \pm 6.12 ^b	24.31 \pm 1.63 ^b	26.68 \pm 1.73 ^b
STZ-400E	23.86 \pm 2.47 ^c	19.32 \pm 0.54 ^c	18.09 \pm 1.73 ^c

All values are mean \pm SE (n=8)

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test

MT의 thiolate clusters(-SH)는 hydroxy radical(\cdot OH)과 superoxide($O_2^{\cdot-}$)의 유능한 방해자로서 작용한다고 보고하였다.

본 실험에서 당뇨병 상태에서 MT가 증가되며 더구나 비타민 E 부족시 더욱 증가되는 것으로 보아 당뇨병으로 인해 유도되는 free radical을 제거하기 위해서 MT의 합성이 증가되었다고 할 수 있다. 당뇨병에서 plasma cortisol level이 증가되는 것과 관련지어 생각해보면 glucocorticoid가 어떻게 MT합성을 촉진시키는가에 대해서는 명확히 밝혀지지는 않았으나, glucocorticoid는 간세포에서 zinc binding protein의 형성을 유도하는 것으로 보고되었다^{44,45}. 즉 이와 같이 STZ으로 유도된 당뇨쥐에 있어서 Zn-MT가 증가한 것은 부분적 체내방어기전으로 생각할 수 있는데, 저질과산화 진행에 대한 방어효과로 zinc의 hepatic uptake가 증가된 결과이거나 plasma glucocorticoid level 증가로 인한 직접적인 효과에 의한 것이라 할 수 있다.

STZ 유발 당뇨쥐의 신장, 소장조직의 MT 함량 변화를 관찰한 결과는 간조직과 마찬가지로 대조군에 비해 당뇨병 유발군 모두 현저하게 증가되었고, STZ-400E군에 비해 STZ-0E군은 현저하게 증가하였다. 이와같이 당뇨병을 일으킨 실험군에서 소장의 MT 함량이 증가한 것은 zinc의 장내흡수가 스트레스와 glucocorticoid에 의해 영향을 받는다는 Bonewitz 등의 보고⁴²와 실험쥐에서 급성감염과 endotoxemia는 ⁶⁵Zn의 흡수를 증가시킨다는 Starcher 등의 보고⁴³로 미루어 STZ으로 인한 당뇨병 쥐에서 zinc흡수가 증가되어 소장의 MT합성이 증가된 것이라 추정할 수 있다.

Cd-MT gel filtration 및 Cd-MT DEAE Sephadex A-25 column chromatography

표준MT를 얻기 위하여 흰쥐에게 Cd(2.5mg/kg of body wt.)을 복강내로 2회 주사하여 24시간 만에 쥐를 희생시켜서 간조직을 추출하여 얻은 Cd-MT를 Sephadex G-75 gel filtration한 결과는 Fig. 2 (A)와 같이 분획 35~45번 부근에서 Cd-MT가 용출되었는데 이 분획부분을 모았다. 여기서 얻은 분획을 DEAE Sephadex A-25 column에 흘려 흡착시키고 tris/acetate buffer의 농도 및 pH linear gradient로 chromatography한 결과 분획 25~34번과 분획 71~80번 부근에 Cd-MTI과 Cd-MTII로 생각되는 두개의 peak가 용출되었다 (Fig. 2 (B)).

실험군의 MT gel filtration 및 실험군의 MT DEAE Sephadex A-25 column chromatography

대조군 및 각실험군의 간조직에서 추출한 cytosol을 gel filtration한 결과는 Fig. 3과 같은 pattern으로 Zn-MT, Cu-MT 둘다 2개의 분획으로 용출되었다. 그러나 25~39번 분획은 확인한 결과 비흡착물질이고 MT로 생각되는 40~49번 분획을 모았다.

여기에서 얻은 분획을 각각 DEAE Sephadex A-25 column에 흘려 흡착시키고 tris/acetate buffer의 농도 및 pH linear gradient로 chromatography한 결과 Zn-MTI과 Zn-MTII로 생각되는 분획이 용출되었고 Cu-MT는 거의 용출되지 않았다 (Fig. 4).

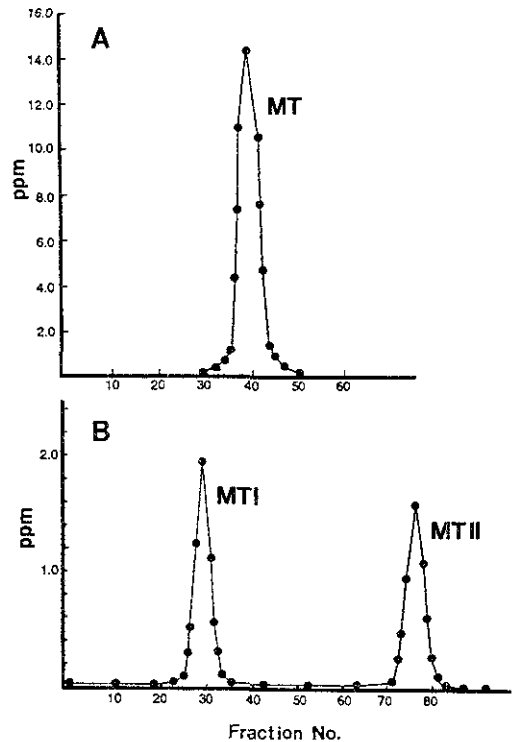


Fig. 2. A) Gel filtration chromatography of Cd-MT in liver cytosol on Sephadex G-75 after single dose of Cd (2.5 mg/kg B.W.) via intraperitoneal injection into rat. Column size, 2.5×60cm; fraction vol., 5ml/tube; flow rate, 17ml/hr.; elution buffer, 10mM tris/acetate (pH 7.4); B) Elution pattern of Cd-MTI and Cd-MTII on DEAE Sephadex A-25 column chromatography from Cd-MT. Column size, 1.5×30cm; fraction vol., 5ml/tube; flow rate, 30ml/hr. Linear gradient elution: Fraction No. 15~55, 10mM tris/Ac. pH 7.4-100mM tris/Ac. pH 8.6; Fraction No. 56~95, 100mM tris/Ac. pH 8.6-200mM tris/Ac. pH 8.6

전기영동에 의한 Zn-MTI, Zn-MTII의 확인

앞에서 행한 일련의 정제과정을 거쳐 Zn-MTI, Zn-MTII로 분리된 것을 SDS계 전기영동으로 확인한 결과는 Fig. 5과 같다. 그 결과 standard로써 정제된 Zn-MTI, Zn-MTII의 단일밴드와 비교해 보았을 때 control은 거의 나타나지 않았고 STZ-0E, STZ-40E군에서 동일한 위치에 나타났음을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 MT

의 특성을 알고자 gel filtration과 anion exchange column chromatography를 행한 결과 당뇨병 유발로 증가하는 MT의 종류로는 주로 zinc와 결합한 Zn-MT이었고, 대조군에 비해 당뇨병 유발군에 있어서 현저하게 Zn-MT가 증가된 것을 관찰할 수 있었는데, Zn-MT의 생리적인 기능은 비록 잘 알려져 있지는 않지만 zinc 대사에 있어서 zinc가 요구되는 효소으로 이동시켜주는 조절

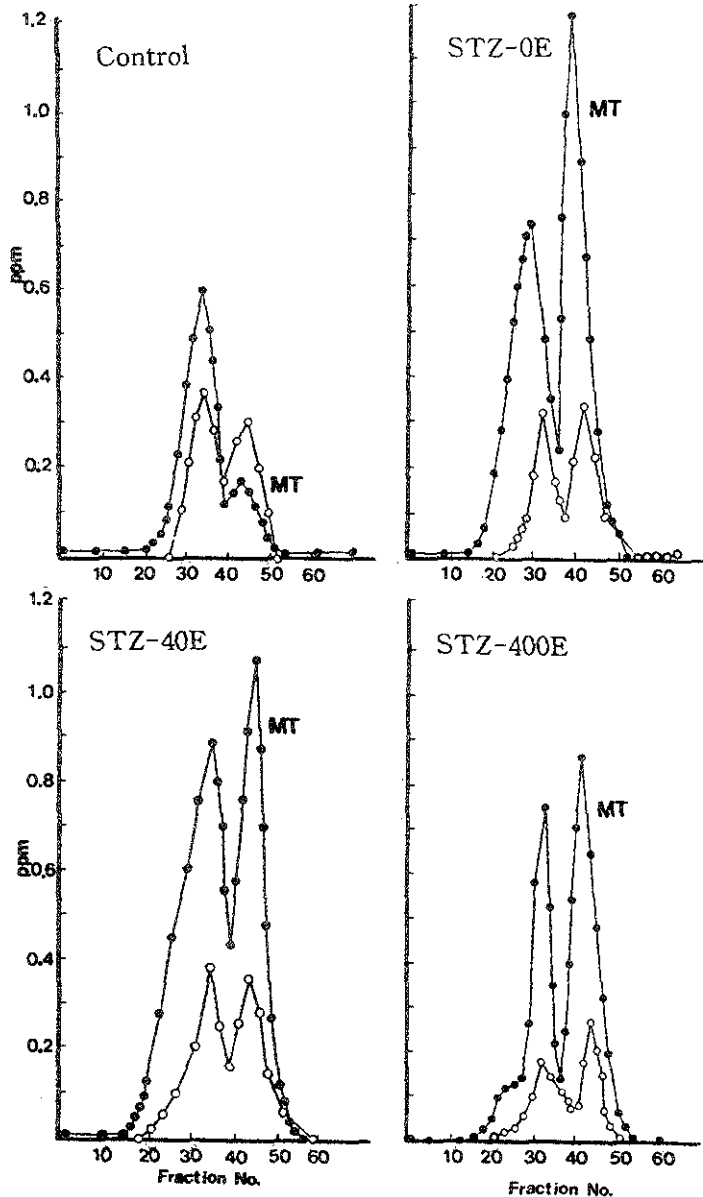


Fig. 3. Gel filtration chromatography of Zn-MT and Cu-MT in rat liver cytosol on Sephadex G-75.

Control group ; without STZ injection after vitamin E 40mg/kg diet. STZ-0E group ; STZ injection after vitamin E free diet. STZ-40E group ; STZ injection after vitamin E 40mg/kg diet. STZ-400E group ; STZ injection after vitamin E 400mg/kg diet. Symbols ; Zn-MT ; ●—● Cu-MT ; ○—○ Other experimental conditions were same as Fig. 2.

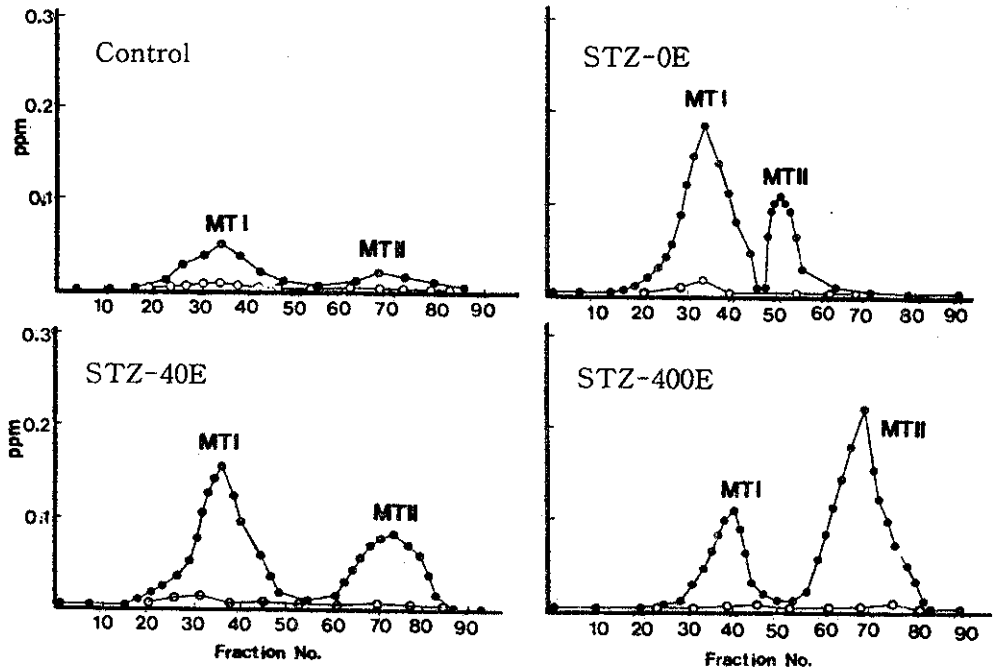


Fig. 4. Elution pattern of Zn/Cu-MTI and Zn/Cu-MTII on DEAE Sephadex A-25 column chromatography.

Symbols : Zn-MT ; ●—● Cu-MT ; ○—○
Other experimental conditions were same as Fig. 2, 3.

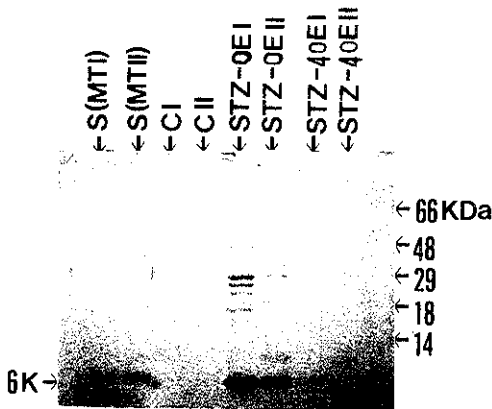


Fig. 5. Identification of MT-I and MT-II by SDS polyacrylamide Electrophoresis.

S ; Standard (Zn-MT), C ; Control group without STZ injection after vitamin E 40mg/kg diet ; STZ-0E, STZ injection after vitamin E free diet ; STZ-40E, STZ injection after vitamin E 40mg/kg diet. 15% SDS polyacrylamide gel ; Traking dye, bromophenol blue (BPB) ; Staining soln., coomassie brilliant blue R-250 ; Destaining soln., 10% acetic acid-7% methanol.

(carbone tetrachloride) 같은 xenobiotics에의 노출 등 다양한 스트레스 상태에 의해 유도되는데 이러한 스트레스 상태들은 oxygen radical 형성을 증가시켜 조직의 손상을 초래한다⁴⁵. Zn-MT는 당뇨병 발생시 항산화제나 zinc 대사의 조절자로서 또한 호르몬의 조절자로서 역할을 할 가능성을 시사해준다. 그리고 Zn-MT 분획을 모아서 DEAE Sephadex A-25 column을 통과시킨 결과 MTI과 MTII 2개의 isoform을 확인할 수 있었다. 2개의 isoform이 MT인가를 확인하기 위하여 SDS-15% PAGE를 행한 결과 이미 정제된 MTI과 MTII와 동일한 위치에 band를 관찰할 수 있었으므로 본 실험에서 분리, 정제해 낸 물질이 Zn-MTI과 Zn-MTII임을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 식이 중 비타민 E의 수준이 증가될수록 반비례하여 지질과산화물의 감소가 관찰되었으며, 이때 간조직 중의 Zn-MT가 같은 양상으로 증가됨으로써 Zn-MT가 free radical을 제거하는 antioxidant로서의 가능성을 시사해 주었다. 그리고 cortisol level이 증가됨과 동시에 Zn-MT가 증가된 것으로 보아 호르몬의 불균형 상태를 조절해주는 역할과 zinc와 copper 대사의 항상성을 유지하기 위한 조절자로서의 역할의 가능성을 시사해 주었다. 또한 간조직과 신장 그리

자로서의 역할을 하는 단백질⁴⁶이고, 산소과다 (hyperoxia), 과온증 (hyperthermia), 방사선조사와 사염화탄소

고 소장조직내의 total MT 함량이 감소되고 분리정제한 Zn-MT의 peak가 감소한 것으로 보아 비타민 E가 당뇨병으로 인한 지질과산화 진행을 상당히 완화시키고 호르몬의 비정상적인 분비를 부분적으로 조절해 줄 수 있고 하나의 인자로서의 가능성을 제시한다.

따라서 metallothionein은 당뇨병 측면에서 보았을 때 새로운 parameter로서 관찰할 수 있는데 metallothionein 유도는 세포내 방어기구에 있어서 zinc와 그 protein 역할에 의해 그 질병의 심한 정도와 효과적인 치료 단계를 반영할 수가 있다. 그러나 metallothionein의 잠재적인 역할에 대해서는 확실하지 않은 부분이 아직 많이 남아 있으므로 앞으로 보다 많은 체계적인 연구가 요구된다.

요 약

식이내 비타민 E 함량을 0mg vit. E/kg diet (STZ-OE 군), 40mg vit. E/kg diet (STZ-40E군) 그리고 400mg vit. E/kg diet (STZ-400E군)로 달리하여 4주간 사육한 후 streptozotocin으로 당뇨병을 유발한 후 4일째에 희생시켜, 당뇨병 쥐에 있어서 MT함수에 미치는 비타민 E의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같다. 체중증가는 STZ를 투여하기 전까지는 대조군에 비해 STZ-OE군만 낮았으나 STZ투여한 후에는 STZ투여군들 모두가 현저하게 감소하였다. 실험군간을 비교해 보면 STZ-400E군이 STZ-OE, STZ-40E군에 비해 STZ를 투여한 후 감소율이 낮았다. 혈당량은 당뇨군들이 대조군에 비해 약 3배 정도 높았으나, 당뇨군들 중에서 비타민 E의 영향은 없었다. 간조직 중의 비타민 E 함량은 STZ-OE 및 STZ-40E군에서는 대조군 보다 각각 50, 36%씩 크게 감소되었으나 STZ-400E군은 차이가 없었다. Glutathione (GSH) 함량은 비타민 E의 다량 첨가군 (STZ-400E)에서 GSH 함량과 GSH/GSSG비가 증가되었다. 간조직 중의 지질과산화는 STZ-OE군과 STZ-40E군이 대조군 보다 5.6, 2.5배씩 높았으나 STZ-400E군은 유의적인 차이가 없었다. Plasma insulin level은 대조군에 비해 당뇨유발군 모두가 현저하게 감소하였고, 비타민 E의 효과는 관찰되지 않았다. Plasma cortisol level은 대조군에 비해 STZ-OE, STZ-40E군이 증가하였으나 STZ-400E군은 이들 두군에 비해 유의적으로 감소하여 대조군 수준이었다. 간장, 신장, 소장조직의 MT 함량은 대조군에 비해 당뇨유발군이 각각 5.3, 2.8, 16배 정도 현저히 증가되었는데 STZ-400E군은 STZ-OE, STZ-40E 이들 두군에 비해 현저하게 감소되었다. Sephadex G-75를 사용하여

간조직 중의 Zn-MT를 분리한 결과 당뇨 유발군에서 대조군 보다 Zn-MT peak가 증가되었으나 Cu-MT는 변화가 없었다. Zn-MT는 DEAE A-25를 사용하여 MTI, MTII peak를 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 STZ유발 당뇨 쥐는 산화적 stress에 더욱 감수성이 높으므로 지질과산화 반응이 정상군에 비해 촉진되었으며, 식이 중 공급되는 비타민 E 함량이 부족시는 더욱 가속화되었다. 더불어 간조직 중의 MT함수도 같은 양상으로 증가되어 당뇨병이 free radical 생성으로 인해 MT를 유도하는 하나의 새로운 인자인 것을 확인하였다. 그러나 식이 중 비타민 E의 다량 급여시는 생체내 항산화계 효소들이 정상군에 가깝게 활성화되고, 생리적 항산화물질이 증가되었다. 따라서 식이비타민 E가 당뇨병으로 인한 지질과산화에 대한 항산화적 방어기구를 강화시키므로써 조직의 과산화적 손상을 완화시키는데 크게 기여함을 알 수 있었다. 또한 비타민 E 다량 투여로 간조직과 신장, 소장조직내의 total MT 함량이 감소되고 분리정제한 Zn-MT의 peak가 감소하는 것으로 보아 MT가 free radical scavenger로서 작용한 것이라고 생각된다.

문 헌

- Margoshes, M. and Vallee, B. L. : A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813 (1957)
- Brender, I. and Young, B. W. : Isolation of (copper, zinc)-thioneins from pig liver. *Biochem. J.*, **155**, 631 (1976)
- Chen, R. W., Whanger, P. D. and Weswig, P. H. : Biological function of metallothionein I. Synthesis and degradation of rat liver metallothionein. *Biochem. Med.*, **12**, 95 (1975)
- Buhler, R. H. O. and Kagi, J. H. : Human hepatic metallothioneins. *Fed. European Biochem. Soc. Letters*, **39**, 229 (1974)
- Kagi, J. H. R., Himmelhoch, S. R., Whanger, P. D., Bethune, J. L. and Vallee, B. L. : Equine hepatic and renal metallothionein. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3537 (1974)
- Winge, D. R. and Rajagopalan, K. V. : Purification and some properties of Cd-binding protein from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 755 (1972)
- Nordbeg, M. : Studies on metallothionein and cadmium. *Experimental Reserch*, **15**, 381 (1978)
- Craft, N. E. and Failla, M. L. : Zinc, iron and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rat. *Am. J. Physiol.*, **244**, E122 (1983)
- Disilvestro, R. A. and Cousins, R. J. : Mediation of endotoxin-induced changes in zinc metabolism in rats. *Am. J. Physiol.*, **247**, E436 (1984)
- Cousins, R. J., Dunn, M. A., Leinart, A. S., Yedinak, K.

- C. and Disilvestro, R. A. : Coordinate regulation of zinc metabolism and metallothionein gene expression in rats. *Am. J. Physiol.*, **251**, E688 (1986)
11. Thonalley, P. J. and Vasak, M. : Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radical. *Biochem. Biophysica Acta*, **827**, 36 (1985)
 12. Thomas, J. P., Bachowski, G. J. and Girotti, A. W. : Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium and zinc-metallothioneins. *Biochem. Biophysica Acta*, **884**, 448 (1986)
 13. Hidalgo, J., Campmany, L., Borrás, M., Garvey, J. S. and Armario, A. : Metallothionein response to stress in rats : role in free radical scavenging. *Am. J. Physiol.*, **255**, E518 (1988)
 14. Yagle, M. K. and Palmiter, R. D. : Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Molecular and Cellular Biology, Fed.*, 291 (1985)
 15. Hidalgo, J., Giralt, M., Garvey, J. S. and Armario, A. : Physiological role of glucocorticoids on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions. *Am. J. Physiol.*, **254**, E71 (1988)
 16. Hidalgo, J., Armario, A., Flos, R., Dingman, A. and Garvey, J. S. : The influence of restraint stress in rats on metallothionein production and corticosterone and glucagon secretion. *Life Sci.*, **39**, 611 (1986)
 17. Brady, F. O. and Helvig, B. : Effect of epinephrine and norepinephrine on zinc thionein levels and induction in rat liver. *Am. J. Physiol.*, **247**, E318 (1984)
 18. Disilvestro, R. A. and Cousins, R. J. : Glucocorticoid independent mediation of interleukin-1 induced changes in serum zinc and liver metallothionein levels. *Life Sci.*, **35**, 2113 (1984)
 19. Bremner, I. and Davies, N. T. : The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.*, **149**, 733 (1975)
 20. Kenkin, R. I. and Smith, F. R. : Zinc and copper metabolism in acute viral hepatitis. *Am. J. Med. Sci.*, **264**, 401 (1972)
 21. Reynolds, C., Molnar, G. D. and Horwitz, D. L. : Abnormalities of endogenous glucagon and insulin in unstable diabetes. *Diabetes*, **26**, 36 (1977)
 22. Urano, S., Midori, H. H., Tochihi, N., Matsuo, M., Shiraki, M. and Ito, H. : Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids*, **26**, 58 (1991)
 23. Hidalgo, J., Giralt, M., Garvey, J. S. and Armario, A. : Physiological role of glucocorticoids on rat serum and liver metallothionein in basal and stress conditions. *Am. J. Physiol.*, **254**, E71 (1988)
 24. DeNicola, A. F., Fridman, O., Castillo, E. D. and Foelia, V. G. : Abnormal regulation of adrenal function in rats with streptozotocin diabetes. *Metab. Res.*, **9**, 469 (1977)
 25. Failla, M. L. and Kiser, R. A. : Hepatic and renal metabolism of copper and zinc in the diabetic rat. *Am. J. Physiol.*, **244**, E115 (1983)
 26. Desbuquois, B. and Aurbach, G. B. : Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 732 (1971)
 27. Winifred, E. I., Josephine, F. and McKee, I. : Serum cortisol levels in severely stressed patients. *The Lancet*, *June*, **19**, 1414 (1982)
 28. Kayden, H. J., Chow, C. K. and Bjornson, L. K. : Spectrophotometric method for determination of α -tocopherol in red cell. *J. Lipid. Res.*, **14**, 553 (1973)
 29. Hawk, P. B., Oser, B. L. and Summerson, W. H. : Ferric chloride dipyriddy method (Emmenrie-Engel reaction). *Practical Physio. Chem.*, 13th ed., J.L.A. Churchill LTD, p.1272 (1956)
 30. Satoh, K. : Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, **90**, 37 (1978)
 31. Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
 32. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 33. Hidalgo, J., Armario, A., Flos, R. and Garvey, J. S. : Restraint stress-induced changes in rat liver and serum metallothionein and in zinc metabolism. *Experientia*, **42**, 1006 (1986)
 34. Sone, T., Yamaoka, K., Minami, Y. and Tsunoo, H. : Induction of metallothionein synthesis in Menkes, and normal lymphoblastoid cells is controlled by the level of intracellular copper. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5878 (1987)
 35. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680 (1970)
 36. Kahn, C. R. : The molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. Med.*, **36**, 429 (1985)
 37. Prichard, K. A., Patel, S. T., Karper, C. W., Newman, H. A. I. and Panganamala, R. V. : Triglyceride-lowering effects of dietary vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. Increased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes*, **35**, 278 (1986)
 38. Panganamala, R. V. and Cornwell, D. G. : The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, **393**, 376 (1982)
 39. Hoguchi, Y. : Lipid peroxides and α -tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Med. Okayama*, **36**, 165 (1982)
 40. Behrens, W. A. and Madere, R. : Vitamin C and vitamin E status in the spontaneously diabetic BB rat before the onset of diabetes. *Metabolism*, **40**, 72 (1991)
 41. Nicola, A. F., Fridman, O., Castillo, E. J. and Foglia, V. G. : Abnormal regulation of adrenal function in rats with streptozotocin diabetes. *Horm. Metab. Res.*, **9**, 469 (1977)
 42. Bonewitz, R. F., Foulkes, E. S., O'Flaherty, E. J. and Hertzberg, V. S. : Kinetics of zinc absorption by the rat

- jejunum : effects of adrenalectomy and dexamethasone. *Am. J. Physiol.*, **244**, G314 (1983)
43. Starcher, B. C., Glauber, J. G. and Madaras, J. G. : Zinc absorption and its relationship to intestinal metallothionein. *J. Nutr.*, **110**, 1391 (1980)
44. Dixon, M. and Webb, E. C. : The enzymes. New York, Academic press, p.1116 (1979)
45. Bond, J. S., Failla, M. L. and Unger, D. F. : Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, **258**, 8004 (1983)

(1995년 1월 19일 접수)