

노중 총아미노산으로 부터 추정한 당뇨병 Rat의 체단백질 대사상태

남택정

부산수산대학교 식품영양학과

The Status of Body Protein Metabolism Based on the Urinary Excretion of Total Amino Acids in Normal and Diabetic Rat

Taek-Jeong Nam

Dept. of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Urinary excretion of total amino acids was measured in normal and diabetic rats, streptozotocin-induced diabetic rats excreted increased amount of urinary total amino acids and nitrogen. This suggested increased degradation of body protein. Although excretion of total amino acids increased in the diabetic rats, the amino acid pattern of amino acids for both groups were very similar. The efficiency of dietary protein utilization was significantly lower in diabetic rats than that of normal rats. Streptozotocin injection affected the urinary excretion of 3-methylhistidine whereas diet did not. These findings suggest that the rate of urinary excretion of total amino acids can be employed as an index of protein metabolism, particularly as a simple index in the assessing the status of protein nutrition.

Key words : urinary amino acid, whole body protein metabolism, diabetic rat

서론

Insulin은 식이 단백질의 이용을 조절하는 중요한 호르몬 중의 하나이며^{1,2)}, rat에 streptozotocin나 alloxan을 투여하면 당뇨병이 유발되어, 체단백질의 손실과 함께 뇨 중에 질소의 배설량도 증가하게 된다. 이와 같이 실험적 당뇨병 rats를 이용한 연구자들이 단백질의 합성속도와 분해속도를 추정하여 보고하고 있지만^{3,4)}, 어느 방법이든지 실험상의 복잡성은 피할 수 없었다. 그래서 본 연구자는 전 연구에서 뇨 중에 배설되는 펩타이드를 index로 하여 체단백질 분해상태를 측정하여 보고한 바 있다^{10,11)}. 본 연구에서는 노중 펩타이드 측정 방법 보다 더 간단히 뇨 중 총아미노산만으로 체단백질 대사상태의 추정이 가능한가를 검토하기 위해 체단백질 분해의 대표적 지표인 당뇨병 rat를 이용하여 실험하였다.

재료 및 방법

실험동물

체중 150g 전후의 Wistar계 숫쥐를 대사 cage에 한 마리씩 넣어 사육하였다. 동물사육실은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$ 로 조정하였고, 명암은 12시간 cycle 조명(8:00~20:00)으로 하여 사료와 물은 자유 섭취시켰다.

식이 및 사육조건

실험 식이조건은 Table 1과 같으며 사육 방법은 처음 6일간 12% casein 식이로써 예비사육한 후 무단백질 식이와 12% casein 식이 2 group으로 나눠 7일간 사육시켰다(Fig. 1).

실험적 당뇨병 유발 rat

무단백질 식이와 12% casein 식이 group을 다시 각각 2 group으로 나눠 각 1 group에 streptozotocin(STZ, 50mg/kg. body wt.)으로 주사하여 7일간 사육시켰다. 또 다른 1 group은 citric acid buffer(pH 4.5)를 주사하

¹ 본 연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호: 913-1509-018-2)에 의한 결과임.

여 control group으로 하였다.

노의 전처리

당뇨병 rat와 control group rat의 뇨를 대사 cage로 모았다. 즉 삼각flask에 10ml의 10% sulfosalicylic acid를 미리 넣어 매일 채뇨한 후 sulfosalicylic acid의 최종 농도가 2% 되게 탈이온수로 희석하고 여과(Whatman No. 44)해서 Dowex 50W×4(H⁺ form)를 채운 colum(2.4×17cm)에 통과시키므로써 sulfosalicylic acid와 염을 제거하였다. 그리고 3N 암모니아수로 용출시켜 그 용출액을 회전진공증발기로써 감압건조 후 탈이온수에 용해시켜 총아미노산 분석용 시료로 하였다.

총아미노산 및 질소분석

조제한 분석용 시료 일정량을 6N HCl로써 가수분해(110°C, 24시간)하여 회전진공증발기로 염산을 제거한 후 아미노산 자동분석기(Hitachi 835-50)를 이용하여 아미노산을 정량하였다. 또 뇨 중 질소량은 semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였다.

혈당값 측정

Fig. 1에서와 같이 사육 마지막날 채혈하여 혈액 중

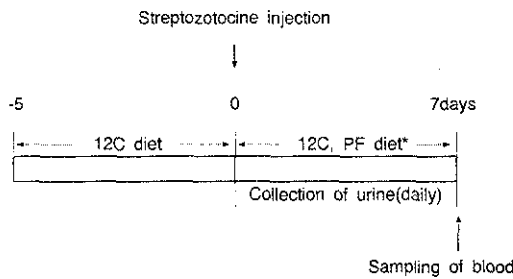


Fig. 1. Experimental design.

12C diet : 12% Casein diet, PF : Protein-free diet

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Protein-free diet	Casein diet
Casein		12.0
Methionine		0.2
β-Corn starch	85.0	72.8
Soybean oil	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Mineral mixture*	4.0	4.0
Vitamin mixture*	1.0	1.0

*The mineral and vitamin mixture (obtained from Oriental Yeast Co., Tokyo)¹⁾

의 당 농도를 glucose oxidase-peroxidase법¹²⁾으로 측정해서 당뇨병 유발 유무를 진단했다.

통계분석

결과를 one way analysis of variance로 처리한 후 follow-up procedure로써 Duncan's multiple range test¹³⁾를 실시하였다.

결과 및 고찰

Control group과 실험적 당뇨병 group의 체중 변화

Rat를 12% casein 식이로 예비사육 후 무단백질 식이와 12% casein 식이 (Table 1)의 두 group으로 나누어 6일간 사육하고, 다시 각 식이 group에서 streptozotocin을 주사한 group과 완충액만 주사한 group으로 나누어 7일간 사육한 결과, streptozotocin 주사 다음날 부터 체중이 감소하는 것을 알 수 있었고 (Fig. 2), 또 7일째 혈당값 (Table 2)은 control group 보다 당뇨병 group이 높은 값을 보임으로서 당뇨병 group의 rat들은 모두 당뇨병에 걸려 있는 상태임을 판단할 수 있었다.

노중 총아미노산 배설에 미치는 식이단백질의 영향

12% casein 식이를 시켰을 때 뇨중에 배설되는 총아미노산 양은 무단백질 식이를 시킨 것 보다 2배 정도 높았고, 많이 배설되는 아미노산은 glx (glutamine + glutamic acid), glycine, asx (asparagine + aspartic acid), pro-

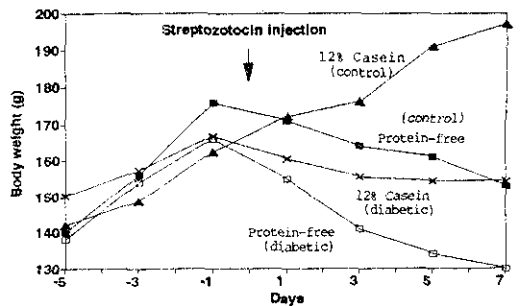


Fig. 2. Changes in body weight of streptozotocin-injected or uninjected rats fed on a casein or a protein-free diet.

Table 2. Blood sugar value

	Blood sugar (mg/100ml)*	
	Control	Diabetic
12% Casein diet	148.9 ± 16.8	430.8 ± 41.3
Protein-free diet	136.7 ± 6.4	684.6 ± 123.3

* Values are means ± SE

line, hydroxyproline 등이었다(Fig. 3). 그리고 무단백질식이 group의 뇨 중 총아미노산 조성 pattern과 12% casein 식이 group의 뇨 중 총아미노산 조성 pattern을 비교하기 위해 무단백질식이 group의 뇨 중 각 아미노산 배설량을 횡축에, 12% casein 식이 group의 뇨 중 아미노산 배설량을 종축에 plot하여 보면 상관계수가 0.895로 나타났다. 즉 단백질을 식이시킨 조건에서도 뇨 중에 배설되는 아미노산 조성의 변화는 거의 없음을 나타내므로 뇨 중에 배설되는 총아미노산이 내인성 대사생성물이라는 하나의 증거가 될 수 있다. 단백질을 증가시키면 아미노산 뇨 중 배설량은 증가하지만 단백질 섭취량과는 평행하지 않으며, 식이 단백질을 10~15배 정도 높게 하여도 뇨 중 아미노산 배설량은 2~3배 이상 더 증가하지 않는다는 보고도 내인성 아미노산 배설에 대하여 뒷받침하는 것이다¹⁴.

실험적 당뇨병 rat의 체단백질 대사상태

뇨 중에 배설되는 총아미노산이 내인성 대사산물이

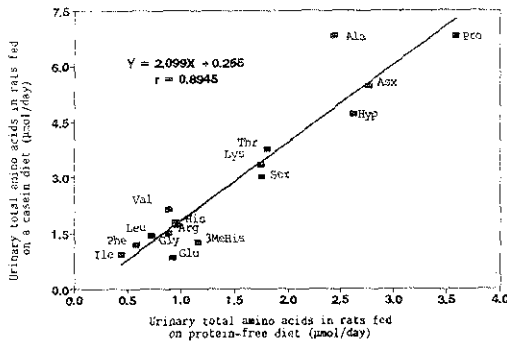


Fig. 3. The total amino acid pattern of urinary from rats fed on a casein diet compared with that of rats fed on a protein-free diet.

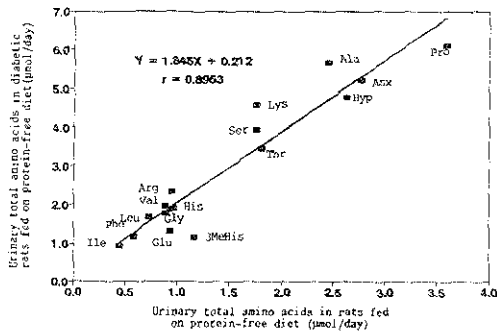


Fig. 4. The total amino acid pattern of urinary from diabetic rats fed on a casein diet compared with that of control rats fed on a protein-free diet.

라는 것을 기초로하여 실험적 당뇨병 rat의 체단백질 분해 상태를 추정하기 위해 Fig. 4과 Fig. 5를 만들어 보았다. 무단백질식이 group의 경우 당뇨병 유발 7일째에 control 보다 약 1.7배 정도 뇨 중 총아미노산이 배설되는 것을 보아 체단백질의 분해가 증가하였음을 추정할 수 있었고, 또 12% casein 식이 group 당뇨병 유발 rat의 경우도 무단백질식이 control에 비해 약 2.8배 정도 증가한 것은 체내 insulin 부족에서 기인되는 식이 단백질 이용효율 저하와 함께 체단백질의 분해가 증가하였음을 추정할 수 있다. 무단백질식이 control group과 당뇨병 group과의 뇨 중 총아미노산 조성을 비교한 결과, 무단백질식이 control group과 당뇨병 group과의 상관계수는 0.895, 무단백질식이 control group과 12% casein 식이 당뇨병 group과의 상관계수는 0.854로 거의 비슷한 아미노산 조성을 나타내고 있다. 이것은 무단백질식이와 단백질 식이에서 나타난 아미노산 조성의 상관성이 높은 것과 함께 고찰할 때 당뇨병에 있어서도 뇨 중에 배설되는 총아미노산 생성경로는 큰 차이가 없는 것을 시사하고 있다. 본 실험에서는 당뇨병 rat의 체단백질 합성속도는 측정하지 않았지만, 현재 당뇨병 발병 때 단백질합성이 저하하는 것은 거의 같은 견해를 보여 주고 있고^{4,5,8,13,16}, 단백질 분해에 대해서는 의견이 다소 차이가 나고 있다. *In vivo* 실험에서는 Millward 등¹⁵이 정속주입법을 이용하여 측정한 결과 6일간의 streptozotocin 당뇨병에서는 분해속도정수가 감소하는 것으로 보고했다. Pain 등¹⁶은 당뇨병의 초기와 만성기에서의 변화가 다른 것에 주목하여 대량투여법을 이용해서 검토한 결과 초기에는 분해항진이 일어나지만, 만성기에서는 역으로 적응 현상이 일어나 분해 억제제가 보여진다고 보고하고 있다. 이와 같이 실험조건이나 측정법의 차이에 의해 모순되는 결과를 얻고 있지만, 본 실험

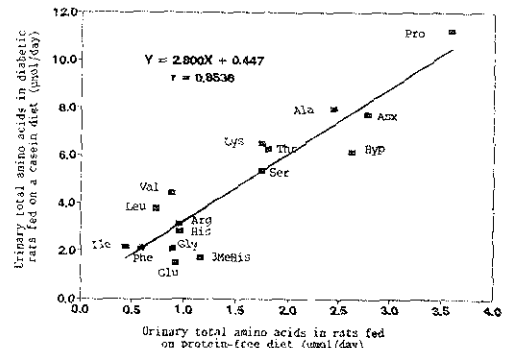


Fig. 5. The total amino acid pattern of urinary from diabetic rats fed on a casein diet compared with that of control rats fed on a protein-free diet.

험의 노중 총아미노산 배설만으로 판정하면 체단백질 분해는 분명히 일어나고 있다.

위와 같은 결과를 기초로 하여 streptozotocin 당뇨병 rat의 체내 질소대사상태를 양적으로 파악하기 위해 다음과 같은 가정을 하여 계산하였다.

(1) 무단백질 식이 때 노중 질소 배설량은 내인성 질소 배설량이다.

(2) 단백질 식이 때 내인성 질소 배설량은 노중 총아미노산 배설량에 비례하는 것으로 가정하여 (1)에서 계산한다.

(3) 12% casein 식이 control group의 노중 질소 배설량은 내인성 질소 배설과 외인성 질소(식이 질소)의 전체량이다.

(4) 당뇨병 group의 무단백질 식이 때 노중 총질소량과 내인성 질소와의 차를 extra 질소로 한다. 여기서 extra 질소는 원래 재이용되는 내인성 질소가 당뇨병으로 인하여 일부 재이용되지 않고 노로 배설되는 질소를 말한다. 이와 같이 계산한 결과는 Table 3에 나타내었다. 여기서 보면 12% casein 식이 당뇨병인 경우 단백질 이용성과 내인성 질소의 재이용성이 크게 저하하는 것이 분명하다. 그러나 산가용성 펩타이드¹¹로서 검토한 12% casein 식이 당뇨병인 경우 식이 단백질 이용율과 비교할 때에 본 실험에서의 12% casein 식이 당뇨병 식이 단백질 이용율은 10% 정도 높게 나타났다. 이것은 노중에 배설되는 총아미노산이 index로서는 산가용성 펩타이드 보다 그 정확성이 떨어진다고 생각된다. 그렇지만 이 방법은 펩타이드 보다 간략하게 측정이 가능하다. 다음은 근육단백질의 분해지표가 되는 3-methylhistidine(3-MH)에 대해서 설명하고자 한다. Insulin의 결핍에 의한 체단백질 분해항진과 함께 근육에서

아미노산 방출 축진이 알려져 있다¹². 본 연구에서도 streptozotocin 투여에 의한 체중감소 및 혈당값 상승과 함께 노중 3-MH 배설량의 증가가 관찰되었다. 3-MH 배설량에서 Funabiki 등¹³의 방법에 의한 분해속도정수를 구하면 Table 4와 같다. 즉 당뇨병의 경우 12% casein 식이, 무단백질 식이 어느 것이나 streptozotocin 투여 2 일째에서 3일째 사이에 분해속도가 최대가 되고 4일째 부터 어느 정도 감소하여 7일째에는 거의 streptozotocin 투여 전의 수준으로 되돌아가고 있다. 이 결과는 당뇨병이 유발될 때 근육단백질쪽이 빨리 분해되어 가고 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과에서 볼 때, 체단백질 대사상태 판정이나 체내 식이 단백질 이용을 추정의 지표로서는 본 연구자가 발표한 노중 산가용성 펩타이드 보다 그 정확성이 약간 떨어짐을 알 수 있었다. 그러나 노중 산가용성 펩타이드 보다 측정법이 간략하므로 앞으로 평가의 지표로 이용하기 위해서는 보충 연구가 필요하다고 본다.

요 약

노중에 배설되는 아미노산으로 당뇨병 rat의 체단백질 대사상태와 식이단백질의 이용효율을 검토하였다. Control group의 무단백질 식이 rat 노중 아미노산 배설량과 당뇨병 유발 rat의 배설량과 비교한 결과, 당뇨병 group에서 아미노산이 많이 배설되었지만, 각 아미노산의 조성은 거의 같은 pattern을 보여 주고 있으므로 노중 아미노산이 내인성 대사 생성물임이 확인되었다. 그리고 노중 아미노산을 토대로 당뇨병 rat 식이단백질의 이용효율은 control 보다 낮았다.

Table 3. Summary of N intake, urinary N excretion and the supposed origin of urinary N in diabetic rats compared with the control rats

	PF-diet*		12C-diet*	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic
Dietary N (mg/d)			297	405
Total urinary N (mg/d)	28	92 ^a	67	289 ^a
Exogenous N	0	0	12	84
Extra N	(0) ^a	27	(0) ^a	60
Endogenous N	28	65 ^a	55	145 ^a
Efficiency of dietary N (%)			96	80

* PF : Protein-free diet
12C : 12% Casein diet

^a Assumed to be 0

^a Significantly different from control (p<0.05 or less) by Tukey's Q test²⁰¹

Table 4. Fractional degradation rate (Kd, % / d) of myofibrillar protein in control or diabetic rats fed a 12% casein or a protein-free diet

Days of experiment	Protein-free		Casein	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic
1		3.40±0.27		4.07±0.26
2	2.54±0.16	6.01±0.15 ^a	2.48±0.12	5.00±0.12 ^a
3		6.08±0.31		4.53±0.21
4	2.65±0.23	5.62±0.34 ^a	2.46±0.12	3.80±0.25 ^a
5		4.81±0.25		4.38±0.30
6	2.60±0.12	5.13±0.19 ^a	2.34±0.06	4.01±0.19 ^a
7		5.15±0.08		4.04±0.29

Values are means ± SE

^ap<0.05 VS control

문헌

1. Munro, H. N. : General aspects of the regulation of protein metabolism by diet and by hormones. In "Mammalian protein metabolism" Munro, H. N. and Allison, J. B. (eds.), Academic press, New York and London, Vol. 1, p.381 (1964)
2. Manchester, K. L. : Site of hormonal regulation of protein metabolism. In "Mammalian protein metabolism" Munro, H. N. (ed.), Academic press, New York and London, Vol. 4, p.254 (1970)
3. Waterlow, J. C., Garlick, P. J. and Millward, D. J. : The effects of nutrition and hormones on protein turnover in muscle. In "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body" North-Holland, New York and Oxford, p.667(1978)
4. Pain, V. M. and Garlick, P. J. : Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4501 (1974)
5. Millward, D. J., Garlick, P. J., Nnaayelugo, D. O. and Waterlow, J. C. : The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem. J.*, **156**, 185 (1976)
6. Millward, D. J. and Waterlow, J. C. : Effect of nutrition on protein turnover in skeletal muscle. *Federation Proceedings*, **37**, 2283 (1978)
7. Flaim, K. E., Copenhaver, M. E. and Jefferson, L. S. : Effects diabetes on protein synthesis in fast- and slow-twitch rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, **239**, E88 (1980)
8. Pain, V. M., Albertse, E. C. and Garlick, P. J. : Protein metabolism in skeletal muscle, diaphragm and heart of diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **245**, E604 (1983)
9. Garlick, P. J., Preedy, V. R. and Reeds, P. J. : Regulation of protein turnover *in vivo* by insulin and amino acids. In "Intracellular protein catabolism" Khairallah, E. A., Bond, J. S. and Bird, J. W. C. (eds.), Alan R. Liss, New York, p.555 (1985)
10. Noguchi, T., Nam, T. J., Kato, H. and Naito, H. : Further studies on the nutritional factors affecting the urinary excretion of acid-soluble peptides in rats. *Brit. J. Nutr.*, **60**, 321 (1988)
11. Nam, T. J., Noguchi, T. and Naito, H. : Changes in the urinary excretion of acid-soluble peptides in rats injected with streptozotocin or dexamethasone : a trial to estimate the changes in the rate of whole-body protein degradation in those rats. *Brit. J. Nutr.*, **65**, 37 (1991)
12. Bergmeyer, H. U. and Bernt, E. : In "Methods of Enzymatic Analysis" Academic press, New York, Vol.3, p.1205 (1974)
13. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : In "Principles and procedures of statistics" McGraw-Hill Book Co., New York (1980)
14. William, H. S., Bearn, A. G. and Stanford, M. : The amino acid content of the blood and urine in wilson's disease. *J. Clin. Invest.*, **33**, 410 (1954)
15. Williams, I. H., Balvin, H. L., Chua, R. H., Sahms, D. S. and Howard, E. M. : Effects of diabetes on protein turnover in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.*, **239**, E178 (1980)
16. Shargill, N. S., Ohshima, K., Bray, G. A. and Chan, T. M. : Muscle protein turnover in the perfused hindquarters of lean and genetically obese-diabetic (db/db) mice. *Diabetes*, **33**, 1160 (1984)
17. Green, M. and Miller, L. L. : Protein catabolism and protein synthesis in perfused livers of normal and all-oxan-diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3202 (1960)
18. Funabiki, R., Watanabe, Y., Nishizawa, N. and Hareyama, S. : Quantitative aspect of the myofibrillar protein turnover in transient state on dietary protein depletion and repletion revealed by urinary excretion of 3-methylhistidine. *Bioch. Biophys. Acta*, **451**, 143 (1976)
19. Rogers, Q. R. and Harper, A. E. : Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J. Nutr.*, **87**, 267 (1965)
20. Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. : Fractional experiments. The split-plot or nested design. In "Statistical Methods" 6th ed., Ames. Iowa State University Press, p.369 (1967)

(1995년 1월 27일 접수)