

Vitamin E와 Selenium이 Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 항산화계에 미치는 영향*

이순재 · 최원경 · 차복경 · 양정아 · 김관유

대구효성가톨릭대학교 식품영양학과

Effects of Vitamin E and Selenium on the Antioxidative Defense System in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Rhee, Soon-Jae · Choe, Won-Kyung · Cha, Bok-Kyung
Yang, Jeong-Ah · Kim, Kwan-You

*Department of Food Science and Nutrition Catholic University of Taegu-Hyousung,
KyongBuk, Korea*

ABSTRACE

The purpose of this study was to investigate the effect of vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanism in the liver of streptozotocin(STZ)-induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats(120 ± 10gm) were randomly assigned to one control and five STZ-diabetic groups. Diabetic groups were classified to STZ-0E(vitamin E free diet), STZ-40E(40mg vitamin E/kg of diet), STZ-400E(400mg vitamin E/kg of diet), STZ-S(0.5ppm Se/kg of diet) and STZ-400ES(400mg vitamin E and 0.5ppm Se/kg of diet) according to the level of vitamin E and selenium supplementation. Diabetes was experimentally induced by intravenous administration of 55mg/kg of STZ in citrate buffer(pH 4.3) after 4-weeks feeding of six experimental diets. Animals were sacrificed at the 4th day of diabetic states. Activities of the serum glutamic oxaloacetate transaminase(GOT) and the glutamic pyruvate transaminase(GPT) in STZ-0E, STZ-40E and STZ-S rats were higher than those of control. Liver xanthine oxidase activities were similar to serum GOT and GPT. Liver superoxide dismutase(SOD) activities were higher in STZ-0E and STZ-40E groups than control. Liver glutathione peroxidase(GSH-Px) activities were lower in the STZ-0E and STZ-40E groups by 33%, 22%, respectively than that of control. Glutathione S-transferase(GST) activities of liver were similar to GSH-Px activities. The contents of vitamin E in liver tissue were significantly lower STZ-0E, STZ-40E and STZ-S groups by 50%, 36%, 45% than that of control. Reduced glutathione(GSH) contents of liver were lower STZ-0E, STZ-40E, STZ-400E, STZ-S and STZ-400ES groups by 57%, 51%, 19%, 18%, 12% than that of control. Lipid peroxide values(LPO) in liver were higher 5.6, 2.3 and 2.3 times in STZ-0E, STZ-40E and STZ-S groups than that of control. 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 accelerated by feeding the low level of dietary vitamin E. In the coincident supplementation of high dietary vitamin E and selenium antioxidative enzymes activities and physiological antioxidants were increased more

채택일 : 1995년 10월 19일

*이 논문은 1994년도 대구효성가톨릭대학교 특별 연구비에 의해 연구되었음.

than those of the separate supplementation of vitamin E or selenium. Therefore, dietary vitamin E and selenium reduced peroxidative damage of tissue, promoting antioxidative defense mechanism against lipid peroxidation by diabetes. (*Korean J Nutrition* 29(1) : 22~31, 1996)

KEY WORDS : diabetes mellitus · antioxidative defense system · vitamin E · selenium · peroxidative damage.

서 론

Free radical은 생체의 정상적인 체내 대사과정 중에서도 생성되지만 당뇨병 환자에서는 free radical 생성계(generating system)가 정상인에 비해 더욱 촉진된다¹⁾. 따라서 당뇨 환자의 경우 간조직이나 심장근육 및 혈청에서의 지질과산화값이 높아 뇌졸중이나 심근경색과 같은 심혈관계 질환을 일으키기 쉽다고 한다. 따라서 당뇨병 환자에서 오는 여러 합병증은 free radical생성에 의한 지질과산화와 관련이 깊다고 볼 수 있다¹⁾.

생체에는 이러한 free radical을 제거해주는 제거계(scavenging system)가 있다. 즉 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione S-transferase(GST), catalase와 같은 효소적 방어계¹²⁾와 glutathione(GSH), 비타민 E, A, C, β -carotene, selenium(Se)과 같은 비효소적 방어계³⁴⁾가 있어 생체를 과산화로부터 보호하고 있다. 그러나 이러한 free radical 제거계의 활성이 저하되거나 혹은 free radical 생성계의 촉진등으로 이들간에 균형이 깨어졌을때 조직은 과산화손상을 입게 되어 노화나 염증반응, 성인병을 촉진하고 나아가 암과 같은 퇴행성질환을 유발케 되므로 산화적 stress에 감수성이 큰 당뇨병에 있어서는 free radical 제거계가 더욱 불안정하다고 볼 수 있다.

선행연구⁵⁷⁾에서 카드뮴(cadmium)이나 납(lead) 및 가열유등의 xenobiotics 독성물질을 흰쥐 체내에 투여했을때 식이내의 Se이나 vitamin E와 같은 항산화제의 적절한 공급시는 생리적 항산화기구를 강하시킴으로써 조직의 과산화적 손상이 감소되었다고 보고한바 있다. 이러한 Se의 항산화작용은 생체내의 GSH-Px, GSH등 SH화합물질의 SH기에 Se이 치환되어 그 생리적 활성을 증가시킨데 기인한 것이라 한다. vitamin E는 비록 Se과 그 기전은 다르지만 세포막의 microsome과 mitochondria에 많이 분포되어있는 불포화지방산의 peroxidation과정에서 chain reaction의 자동산화를 방지하여 과산화물 형성을 방지함으로써 궁극적으로 생체막을 보호하여 세포의 정상적 기능을 유지시키는데 기

여한다고 알려져있다⁷⁾. 최근 이동⁸⁾의 연구에서 이들 두 항산화제를 동시 공급시는 상호절약 및 보완작용으로 인한 상승효과에 대한 연구도 보고되고 있다.

그러나 free radical 생성계가 촉진되고 산화적 stress에 민감한 당뇨쥐에서의 항산화제와 이들 두 항산화제의 동시공급에 의한 상승효과에 대한 연구는 거의 볼 수 없었다. 그러므로, 본 연구에서는 서로 기전이 다른 이 두항산화제를 동시에 투여했을때 이들의 상승효과가 당뇨쥐의 항산화적 방어기구에 미치는 영향을 규명하고자 식이내함량을 달리한 vitamin E와 Se을 동시에 급여하여 일정기간 사육한 후 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시켜 간장조직의 과산화적 손상정도와 조직의 과산화로부터 보호하는 효소적 비효소적 항산화방어제의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

실험동물은 체중 120gm 내외의 Sprague-Dawley종 숫컷을 일주일간 예비사육한 후 난피법(randomized complet block design)에 의해 Table 1과 같이 식이내의 vitamin E와 Se함유량에 따라 각 10마리씩 6군으로 나누어 4주간 사육하였다. Se은 sodium selenite, vitamin E는 dl- α -tocopheryl acetate를 식이에 혼합하여 급여하였다.

기본 실험 식이조성은 Table 2와 같다.

Table1. Classification of experimental groups

| Groups | Vitamin E ²⁾ | Se ³⁾ | STZ injection |
|-----------------------|-------------------------|------------------|---------------|
| | (mg/Kg diet) | (ppm) | |
| Control | 40 | 0 | - |
| STZ ¹⁾ -0E | 0 | 0 | + |
| STZ-40E | 40 | 0 | + |
| STZ-400E | 400 | 0 | + |
| STZ-S | 0 | 0.5 | + |
| STZ-400ES | 400 | 0.5 | + |

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

2) Vitamin E : dl- α -tocopheryl acetate

3) Sodium selenite : Na₂ SeO₃

2. 당뇨 유발, 식이섭취량, 체중증가량 및 식이 효율

실험동물을 희생하기 4일전에 streptozotocin(STZ) 55mg/kg of body weight을 신선한 citrate buffer pH 4.3에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사한 후 4일만에 혈당량이 300mg/dl 이상인 동물만 실험 결과에 사용하였다. 식이와 식수섭취량 및 체중은 전 실험기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 전 체중 증가량을 같은 기간 동안의 식이섭취량으로 나누어 줌으로써 계산하였다.

3. 시료채취와 blood glucose, 혈장 insulin, 혈청 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성 측정

실험 종료후 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, GOT, GPT 측정용으로, 혈장은 insulin 측정용으로 각각 사용하였다. 그리고 간장은 적출하여 생리식염수

로 씻어내고 무게를 측정한 후 액체질소로 급동결시켜 -80℃에 보관하였다. Blood glucose는 아산제약의 혈당 측정용 kit를 사용하여 측정하였고, Plasma insulin은 Radioimmunoassay 법¹⁰⁾에 따라 Insulin RIABEAD II Kit(Abbott)를 사용하여 측정하였다. 혈청 GOT, GPT 활성측정은 Reitman과 Frankel¹¹⁾의 방법을 응용한 아산제약의 GOT,GPT 측정용 Kit를 사용하여 측정하였다.

4. 간조직중의 xanthin oxidase(XOD), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) 및 glutathione S-transferase(GST) 활성 측정

간조직의 XOD 활성도 측정은 xanthine을 기질로 하여 30℃에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 파장 292nm에서 흡광도를 측정하는 Stripe와 Della Corte¹²⁾의 방법을 이용하였고, SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 탈색을 이용한 Marklund and Marklund¹³⁾의 방법에 따라 측정하였으며, GSH-Px 활성은 산화형 glutathione(GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될때 340nm에서 NADPH의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 Lawrence 및 Burk¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. 그리고 GST 활성 측정은 2, 4-dinitrochlorobenzene(DNCB)와 환원형 glutathione을 기질로 하여 25℃에서 20분간 반응하는 동안에 생성된 GSH-DNCB conjugate의 분자 흡광도계수($E^{1\text{cm}}_{340\text{nm}} = 9.6\text{mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 산출하는 Habig등¹⁵⁾의 법에 의하여 측정하였고. 이 효소활성의 단위는 1분간 1mg의 단백질이 반응하여 생성한 conjugated DNCB를 nmol로 나타내었다.

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's⁹⁾ g per/100g of salt mixture : CaCO₃, 30.0g ; CaHPO₄, 7.5g ; K₂HPO₄, 32.2g ; KI,70mg ; CuCl₂. 5H₂O, 35mg ; ZnCl₂, 25mg ; CoCl₂. 5H₂O, 5mg ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄. 4H₂O, 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)

5. 간조직중의 glutathione, vitamin E함량 측정 및 과산화지질측정

Glutathione의 농도 측정은 Bernt와 Bergmeyer¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였으며 vitamin E측정은 간조직 마쇄액 1.0ml를 Kayden¹⁷⁾의 방법과 ferric-chloride dipyridyl법¹⁸⁾에 의해 측정하였다. 간조직중의 과산화지질(Lipid peroxide value : LPO)의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 생성되는 malonaldehyde를 측정하는 Satoh¹⁹⁾ 방법을 이용하였다.

6. 단백질 정량

각 시료의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였으며 vitamin E의 단백질정량은 Biuret²⁰⁾ 그리고 각 효소의 단백질정량은 Lowry법²¹⁾을

이용하여 정량하였다.

7. 통계처리

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

결 과

1. 체중증가, 간장의 무게, 식이 섭취량 및 식이 효율

실험 4주간 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 전실험기간 동안 체중변화를 관찰한 결과(Table 3) streptozotocin(STZ)을 투여하기 전까지는 대조군에 비해 STZ-0E군만 낮았으나 STZ를 투여한 후에는 STZ 투여군들은 모두 현저하게 감소하였다. 실험군간의 체중감소량을 비교해 보면 STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군이 STZ-0E, STZ-40E군에 비해 STZ를 투여한 후 감소율이 낮았다.

식이섭취량은 STZ 투여 전에는 대조군과 각 실험군간에 차이가 없었으나 STZ 투여 후는 대조군에 비해 STZ-0E군에서 감소하였다. 따라서 식이효율도 STZ 투

여 전에는 STZ-0E군에서만 낮았으나 STZ 투여 후에는 대조군에 비해 모든 당뇨군이 현저하게 감소하였으며 그 중에서도 STZ-0E군이 가장 낮았다. 간장의 무게는 대조군에 비해 STZ-0E군이 감소되었으며 STZ-40E, STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군은 차이가 없었다.

2. Blood glucose 함량과 혈장 Insulin 수준

당뇨유발과 그 정도를 관찰하기 위하여 희생하기 전 6시간 절식시킨 후 혈당량을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 모든 당뇨병유발 실험군이 대조군에 비해 약 3배 정도 혈당량이 높았으며, 당뇨유발 실험군 간에는 STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군이 STZ-0E군에 비해 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 혈장 insulin은 대조군에 비해 당뇨병 유발군 모두 31%, 23%, 31%, 28%, 28%씩 각각 감소하였으며, 당뇨유발군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

3. 항산화계에 관한 관찰

1) Xanthine oxidase

Xanthine을 기질로하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소 즉, free radical generation 효소로 알려진 xanthine oxidase(XOD)의 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같이 대조군에 비해

Table 3. Body weight increase, liver weight, food intake and 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 ^a | 330.81 ± 19.35 | 0.302 ± 0.039 ^{ab} | |
| STZ-S | 105.0 ± 6.83 ^a | 343.25 ± 25.45 | 0.306 ± 0.034 ^{ab} | |
| STZ-400ES | 112.0 ± 10.46 ^a | 362.33 ± 21.37 | 0.309 ± 0.041 ^{ab} | |
| After STZ injection 4 days | | | | |
| Control | 20.0 ± 1.15 ³ | 80.82 ± 14.35 ³ | 0.248 ± 0.018 ^a | 11.25 ± 0.94 ^a |
| STZ-0E ¹ | -50.0 ± -4.37 ^b | 38.35 ± 1.65 ^b | -1.304 ± -0.123 ^b | 5.41 ± 0.25 ^b |
| STZ-40E ² | -65.0 ± -5.24 ^b | 71.46 ± 9.70 ^a | -0.910 ± -0.088 ^c | 8.57 ± 0.47 ^a |
| STZ-400E ³ | -35.0 ± -2.10 ^c | 72.30 ± 5.45 ^a | -0.484 ± -0.050 ^c | 8.68 ± 0.71 ^a |
| STZ-S ⁴ | -50.0 ± -3.46 ^b | 63.80 ± 7.63 ^a | -0.784 ± -0.034 ^d | 7.98 ± 0.67 ^a |
| STZ-400ES ⁵ | -34.0 ± -5.64 ^c | 74.79 ± 6.55 ^a | -0.455 ± -0.072 ^c | 8.88 ± 0.53 ^a |

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.

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

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

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

4 STZ- S group : STZ injection after Selenium supplementation(0.5ppm/kg diet)

5 STZ-400ES group : STZ injection after Vitamin E(400mg/kg diet)

+Selenium supplementation(0.5ppm/kg diet)

당뇨병 유발군(STZ-40E)은 그 활성이 증가되었으며 특히 비타민 E가 결핍된 STZ-0E군은 현저하게 증가되어 superoxide radical생성이 촉진되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 비타민 E를 다량 공급한 STZ-400E군에서는 다른 당뇨유발군 보다 XOD활성이 감소되었다. STZ-S군에서는 STZ-40E군과 비슷한 수준이었으나

STZ-400ES군에서 대조군과 STZ-400E군과 같은 수준이었다.

2) Superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) glutathione S-transferase(GST)

항산화 효소활성을 측정할 결과는 Table 5와 같다. 간 조직에서의 SOD활성은 대조군에 비해 STZ-40E, STZ-0E군은 유의적으로 증가되었으나 STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES 군간은 차이가 없었다. GSH-Px활성은 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E군에서는 33%, 21%씩 각각 감소되었으나 STZ-400E군에서는 13% 증가되었고, STZ-S, STZ-400ES군은 77%, 121%씩 현저히 증가 되었다.

그리고 GST 활성은 GSH-Px의 결과처럼 역시 STZ-0E, STZ-40E군에서는 대조군보다 23.6%, 19.9% 감소되었으나 STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군에서는 이들 두군보다 증가되었다.

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

| Groups | Blood glucose (mg/dl) | Insulin (μ u/ml) |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|
| Control | 133.91 \pm 4.70 ^a | 21.47 \pm 0.86 ^a |
| STZ-0E | 445.25 \pm 29.39 ^b | 14.90 \pm 0.96 ^b |
| STZ-40E | 443.72 \pm 37.60 ^b | 16.58 \pm 0.62 ^b |
| STZ-400E | 421.06 \pm 9.35 ^b | 14.88 \pm 1.61 ^b |
| STZ-S | 401.32 \pm 47.03 ^b | 15.48 \pm 1.36 ^b |
| STZ-400ES | 407.17 \pm 20.73 ^b | 15.49 \pm 0.40 ^b |

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.

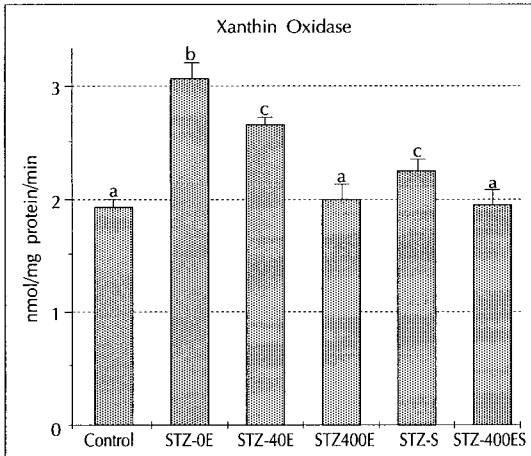


Fig. 1. Effect of dietary vitamin E and selenium on xanthine oxidase activity in liver tissue of STZ-induced diabetic rats. Different letter on the top of the line indicates significant difference between groups by Tukey's test $p < 0.05$.

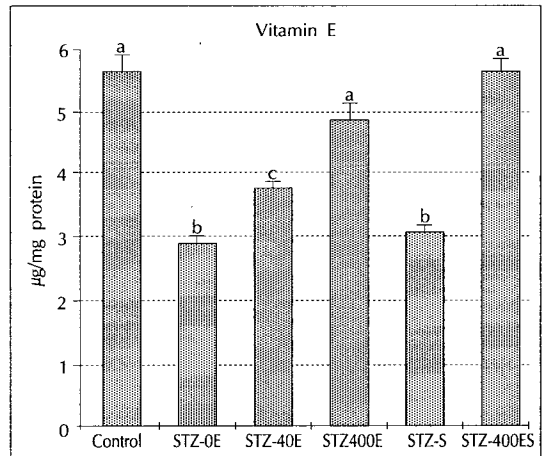


Fig. 2. Effect of dietary vitamin E and selenium on vitamin E contents in liver tissue of STZ-induced diabetic rats. Different letter on the top of the line indicates significant difference between groups by Tukey's test $p < 0.05$.

Table 5. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver tissue of STZ-induced diabetic rats

| Groups | SOD (Unit/mg protein) | GSH-Px (nmolNADPH/min/mg protein) | GST (nmolDNCB/mg protein/min) |
|-----------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Control | 3.40 \pm 0.09 ^a | 274.61 \pm 9.81 ^a | 501.27 \pm 28.66 ^a |
| STZ-0E | 3.71 \pm 0.08 ^b | 184.41 \pm 10.19 ^b | 382.96 \pm 2.45 ^b |
| STZ-40E | 3.79 \pm 0.09 ^b | 217.96 \pm 16.53 ^c | 401.75 \pm 8.43 ^c |
| STZ-400E | 3.42 \pm 0.09 ^a | 311.90 \pm 14.25 ^d | 653.57 \pm 33.29 ^d |
| STZ-S | 3.47 \pm 0.16 ^a | 485.70 \pm 27.64 ^e | 508.55 \pm 15.70 ^d |
| STZ-400ES | 3.28 \pm 0.16 ^a | 607.60 \pm 29.35 ^f | 670.18 \pm 33.56 ^d |

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.

3) 간조직중의 vitamin E함량

간조직중의 비타민 E 함량은 Fig. 2와 같이 대조군에 비해 STZ-0E 및 STZ-40E군은 각각 50%, 36%씩 감소되었다. 그러나 STZ-400E군은 대조군보다 다소 낮았지만 유의적인 차이는 없었고, STZ-S군은 대조군에 비해 45% 감소 되었으나 STZ-400ES군은 대조군 수준으로 증가 하였다.

4) 간조직중의 glutathione 함량

비효소적 방어기구중의 또다른 하나인 간조직중의 환원형 glutathione(GSH)함량은(Table 6) 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E, STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군이 각각 57%, 51%, 19%, 18%, 12%씩 감소 되었으나 산화형 glutathione(GSSG)함량은 그 반대로 61%, 53%, 31%씩 증가되었고, STZ-S, STZ-400ES군은 대조군과 비슷한 수준이었다. 따라서 GSH/GSSG비율은 STZ-0E군은 대조군에 비해 거의 1/2수준으로 STZ-40E군은 1/3수준으로 감소되었으나 STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군은 대조군의 62%,

84%, 88%수준을 유지하였다.

4. 간조직의 손상에 관한 관찰

1) 혈청 GOT, GPT활성

간장의 손상을 관찰하기 위하여 혈청중의 GOT, GPT활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 비타민 E을 정상으로 공급한 당뇨병유발 실험군인 STZ-40E군은 대조군에 비해 1.1배, 1.3배 증가하였고 다량 투여한 STZ-400E군에서는 대조군에 비해 유의성이 없었으나 비타민 E가 부족한 상태에서 당뇨병을 유발한 STZ-0E군은 GOT, GPT활성이 각각 2.3배, 3.9배나 높았다. Se을 투여한 STZ-S군은 대조군에 비해 1.1배 증가하였으나 STZ-400ES군은 대조군과 비슷한 수준이었다.

2) 간조직중의 과산화지질 함량

생체조직의 과산화적 손상의 지표로 알려져 있는 지질 과산화가(lipid peroxide : LPO)를 측정한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 STZ-40E군은 2.3배 높았고 비타민 E가 부족한 STZ-0E군은 대조

Table 6. Effect of dietary vitamin E and selenium on liver glutathione contents in STZ-induced diabetic rats

| Groups | GSH | GSSG | GSH/GSSG |
|-----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Control | 5.42 ± 0.33 ^a | 0.17 ± 0.01 ^a | 33.69 ± 3.47 ^a |
| STZ-0E | 2.32 ± 0.29 ^b | 0.27 ± 0.02 ^b | 8.97 ± 0.59 ^b |
| STZ-40E | 2.64 ± 0.42 ^b | 0.25 ± 0.01 ^b | 10.00 ± 1.74 ^b |
| STZ-400E | 4.38 ± 0.29 ^c | 0.23 ± 0.01 ^c | 19.04 ± 1.81 ^c |
| STZ-S | 4.45 ± 0.27 ^c | 0.16 ± 0.02 ^c | 28.42 ± 4.03 ^c |
| STZ-400ES | 4.75 ± 0.43 ^c | 0.18 ± 0.02 ^c | 29.71 ± 5.31 ^c |

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.

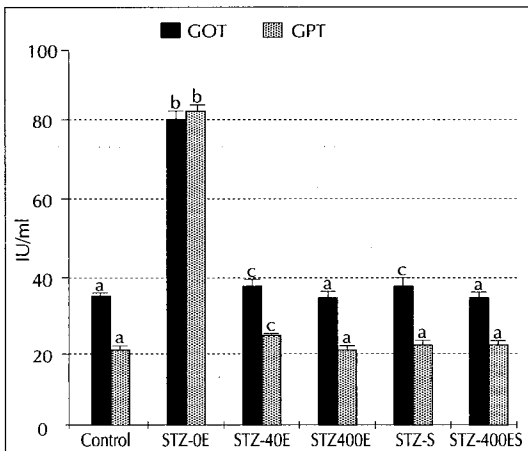


Fig. 3. Effect of dietary vitamin E and selenium on serum GOT and GPT in STZ-induced diabetic rats. Different letter on the top of the line indicates significant difference between groups by Tukey's test p < 0.05.

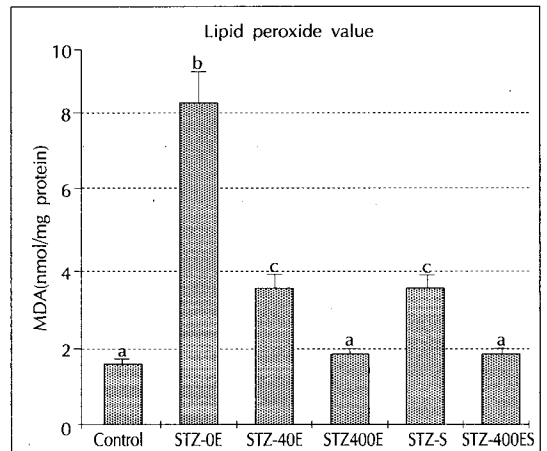


Fig. 4. Effect of dietary vitamin E and selenium on lipid peroxide values in liver tissue of STZ-induced diabetic rats. Different letter on the top of the line indicates significant difference between groups by Tukey's test p < 0.05.

군에 비해 5.6배나 높았다. 그러나 비타민 E를 다량 투여한 STZ-400E에서는 대조군과 비슷한 수준이었고, STZ-S군은 대조군에 비해 2.3배 높았으며, STZ-400ES군은 대조군과 비슷하였다.

고 찰

본 실험에서 체중 증가량을 관찰한 결과 대조군은 전 실험기간 동안 지속적인 증가를 보인 반면 STZ 유발 당뇨병군들은 STZ를 주사한 다음날부터 현저하게 체중감소를 보였는데 이는 많은 당뇨병 실험²²⁾²³⁾에서 보고된 것과 같은 결과였다. 그러나 비타민 E 다량 투여군 STZ-400E과 Se동시투여군인 STZ-400ES군은 STZ-0E, STZ-40E 군에 비해 비교적 체중감소가 적은 것으로 보아 비타민 E나 Se같은 항산화제는 당뇨병으로 인한 여러 대사변화를 다소 완화시킬 수도 있다는 가능성을 시사하였다. 식이 섭취량은 STZ 유발전에는 식이군간의 차이가 없었으나 STZ 유발 후에는 STZ-0E군이 대조군에 비해 감소하였다. 식이 효율은 STZ 유발전에는 STZ-0E군만 대조군에서 감소되었으나 STZ 유발 후에는 당뇨유발군 모두가 감소되었다. 식이 비타민 E의 공급수준이 낮을수록 식이효율이 낮았다. 이는 선행²¹⁾ 연구에서의 결과와 비슷하였다.

당뇨유발 정도를 관찰하기 위하여 혈청중 glucose 함량을 측정된 결과 대조군에 비해서 당뇨병 유발군에서 모두 심한 고혈당현상이 초래되었으며, 비타민 E와 Se의 투여 영향은 관찰되지 않았는데, 이는 STZ에 의해 유발한 당뇨쥐에서 비타민 E와 같은 항산화제는 insulin 함량과 glucose 함량에 영향을 미치지 않았다는 연구 결과와 일치하였다.²⁵⁾

간조직중의 XOD는 virus 등의 감염 및 xenobiotics의 증독에 의한 간 손상에 그 활성이 증가하며 이때 superoxide radical을 생성한다²⁶⁾²⁷⁾. 본 실험에서 STZ-유발 당뇨병군인 STZ-0E, STZ-40E, STZ-S군에서 대조군에 비해 XOD활성이 64%, 40%, 21% 순으로 높았고, STZ-400E군과 STZ-400ES군은 대조군과 비슷한 수준 이었다. 이러한 결과는 STZ 유발 당뇨병 쥐에서 xanthine의 산화가 증가되어 XOD활성이 증가한다는 Urano 등²⁸⁾의 보고와 일치하였다. 따라서 STZ를 주사한 쥐에서는 XOD활성이 증가되어 superoxide radical 생성이 높아지는 것으로 생각되며 비타민 E 결핍시는 XOD활성이 더욱 증가된 것으로 보아 XOD의 활성증가가 산화적 손상의 한 요인으로 작용했음을 알 수 있었고 또 충분한 비타민 E 투여는 XOD활성을 감소시킬 수 있었다.

본 실험에서 SOD활성이 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E군에서는 유의적으로 증가되었으며, STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군은 대조군과 차이가 없었다. GSH-Px활성도는 대조군에 비해 실험군 STZ-0E, STZ-40E 군은 33%, 21%씩 감소하였으나 STZ-400E 군은 오히려 증가하였고, STZ-S, STZ-400ES군은 더욱 현저하게 증가 하였다. 또한 변이원성 물질, 발암성 물질, 독성 물질 등의 대사산물, 그리고 내인성 독소들 중에서 친전자성 물질 등에 환원형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester(R-S-G)를 형성하는 반응을 촉매하는 GST²⁹⁾ 역시 STZ로 당뇨병을 유발함으로써 그 활성이 감소하였는데 식이내 비타민 E의 공급수준이 낮을수록 더욱 현저하게 감소하였다. 이와 같이 STZ로 유발한 당뇨 실험군에서 SOD활성은 oxygen radical을 제거하기 위하여 증가하였으나 GSH-Px와 GST활성은 감소되었다. 이러한 현상은 당뇨쥐에서 불포화지방산 함량이 높은 생체막이 산화적 stress에 대해 민감하여 지질과산화이 일어나 이로 인해 효소활성에 필요한 세포소기관들의 과산화적 손상이 가속화되므로써 효소활성이 저하된것으로 본다²⁸⁾²⁹⁾. 이것은 당뇨병에서 항산화 효소활성을 관찰한 Matkovic 등³⁰⁾의 보고와 일치하였다. 그러나, 비타민 E를 다량 공급했을때 그리고 Se을 투여하였을때는 GSH-Px와 GST와 같은 항산화효소 활성이 증가하여 정상군에 가깝게 회복되었다. 이러한 결과는 비타민 E가 생체막에 다량존재하는 다불포화지방산에 대해 chain-breaking antioxidant로서 작용하여 세포막의 소기관들을 과산화로부터 보호함으로써 효소활성의 최적구조를 유지시켜 주는데 기여하기 때문으로 생각된다²⁶⁾. 그리고 비타민 E와 Se이 결핍된 식이에 Se을 첨가하여 닭에게 투여한 결과 간에서의 GSH-Px활성이 증가한다는 보고와 일치하며, 이는 필수 미량원소인 Se이 GSH-Px의 구성성분으로 대사과정에 생성되는 과산화물의 분해에 관여한다고 본다.

또한 체내의 비효소적 항산화방어계로는 glutathione(GSH)과 비타민 E가 있다. 당뇨병 유발군에서는 대조군에 비해 간조직중의 GSH 함량은 감소되고 GSSG함량은 증가되면서 GSH/GSSG비가 감소되었으나 비타민 E와 Se을 공급함으로써 GSH함량 및 GSH/GSSG가 증가되었는데 이러한 결과는 비타민 E와 Se이 GSH 소모를 감소시킬 수 있을 것이다. 또 다른 생리적 항산화물질인 간조직중의 비타민 E 함량이 당뇨유발군에서 식이중 비타민 E 공급수준에 비례해서 역시 감소하였으나 비타민 E와 Se을 동시에 투여한 STZ-400ES군과 STZ-400E군은 대조군 수준으로 유지되었다. 이러한 결과는 Se이 비타민E의 절약작용을 할

수 있다는 연구보고⁸⁾와 일치된다.

체내 과산화적 손상의 지표가 되는 지질과산화기 (lipid peroxide value : LPO)는 STZ 유발 당뇨병군인 STZ-40E 군에서는 대조군에 비해 2.5배 증가되었고 비타민 E가 결핍된 STZ-0E군은 5.6배 높았으나, 다량 투여군인 STZ-400E군과 Se 동시투여군인 STZ-400ES군에서는 대조군 수준이었다. 이와같이 STZ-유발 당뇨병에서 지질과산화값이 현저하게 증가되는 것은 당뇨병유발군에서는 free radical generation이 항진된다는 선행연구와 일치하였다. 식이 비타민 E 함유량에 따라 LPO값이 현저하게 감소된 것은 비타민 E가 chain-breaking antioxidant 역할과 같은 일차적인 항산화기능과 항산화기구를 강화시키는 이차적인 역할에 기인된 것이라 본다^{7,22)}. 또 Se은 glutathione peroxidase system 구성요소로서 기여하므로써 vitamin E와 상호 보완작용을 하는 것으로 생각된다. 이런 결과는 Se 단독으로는 직접적으로 과산화물축적을 저해시키지 못하는 결과를 시사하고 있다. 또한 간조직 손상시에 혈중으로 유출되어 나오는 GOT, GPT의 활성도 역시 지질과산화물가의 변화양상과 비슷한 결과였다. 그러므로 비타민 E가 결핍된 상태에서 당뇨병이 발생하였을 때는 간조직의 손상이 더욱 현저하게 나타남을 알 수 있으며, 비타민 E의 다량 투여로 이러한 현상이 크게 완화되었다고 볼 수 있으며 Se 첨가시에는 비타민 E 결핍에 의한 간조직의 손상에 대해 어느정도 보호해주는 역할을 한다는 것을 알 수 있으며, Se의 역할에 대해서 연구한 Raymond²¹⁾의 보고와도 일치하였다.

이와같이 본 실험에서의 항산화계 효소활성을 관찰한 결과 당뇨병 유발군에서 식이중 비타민 E 공급 수준이 증가됨에 따라 free radical을 생성하는 효소인 XOD 활성이 비례해서 저해되는 반면 free radical scavenging 효소인 GSH-Px, GST 활성은 비례하여 증가하였다. 즉 비타민 E를 다량공급한 STZ-400E군이나 또 Se을 동시에 공급한 STZ-400ES군에서는 XOD 활성은 저하되고 free radical scavenger 효소인 SOD, GSH-Px, GST 활성이 정상군에 가깝게 회복되었고, 또 체내 항산화물질인 간조직중의 비타민 E와 GSH 함량이 증가되는 등의 결과를 보아 당뇨병 발생시 적절한양의 비타민 E와 Se을 동시투여시는 항산화적 방어기구를 강화시켜 간조직의 과산화지질과 및 혈청 GOT, GPT 활성을 감소시키는 등 과산화적 손상을 크게 완화시킬 수 있다고 볼 수 있다.

이상의 결과에서 STZ유발 당뇨쥐는 산화적 stress에 감수성이 높아서 지질 과산화 반응이 정상군에 비해 촉진되고, 식이중 공급되는 항산화제의 함량이 부족시는

더욱 가속화되었다. 그러나 식이중 적절한 수준의 비타민 E와 Se의 동시공급시는 체내 항산화계 효소들이 정상군에 가깝게 활성화되고, 생리적 항산화물질이 증가되었다. 따라서 식이비타민 E와 Se의 적절한 공급은 당뇨병으로 인한 지질과산화에 대한 항산화적 방어기구를 강화시키므로써 조직의 과산화적 손상을 완화시키는데 크게 기여함을 알 수 있었다. 또한 비타민 E와 Se의 동시공급은 각각 단독투여시 보다 상호 상승효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

요약 및 결론

식이내 비타민 E 와 Se함량을 달리하여 STZ-0E군 (0mg vit E/kg diet), STZ-40E군 (40mg vit E/Kg diet) 그리고 STZ-400E군 (400mg vit E/kg diet), STZ-S군 (0.5ppm Se/kg diet) 및 STZ-400ES군 (400mg vit E/kg diet 와 0.5ppm Se/kg diet)으로 나누어 4주간 사육한 후 streptozotocin으로 당뇨병을 유발한 후 4일째에 희생시켜, 당뇨병 쥐에 있어서 체내 항산화적 방어계에 미치는 비타민 E와 Se의 영향을 관찰하였다.

혈당량과 Plasma insulin level은 당뇨병군들이 대조군에 비해 현저하게 낮았으며, 식이 비타민 E와 Se의 영향은 없었다. 간조직중의 xanthine oxidase 활성도 비슷한 경향이었으며, 간조직중의 SOD 활성은 대조군에 비해 STZ-0E, STZ-40E군에서는 증가되었으나, 그외 군들은 차이가 없었다. GSH-Px와 GST 활성은 STZ-0E, STZ-40E군에서는 대조군에 비해 현저하게 감소되었으나, STZ-400E군, STZ-S군, STZ-400ES군은 대조군 보다 증가 되었다. 간조직중의 비타민 E 함량은 STZ-0E 및 STZ-40E군에서는 대조군보다 크게 감소되었으나, STZ-400E, STZ-400ES군은 차이가 없었다. 간조직중의 환원형 glutathione(GSH) 함량은 STZ-0E, STZ-40E, STZ-400E, STZ-S 및 STZ-400ES군에서 대조군 보다 각각 58%, 51%, 19%, 18%, 12%씩 감소되었고 산화형 glutathione(GSSG) 함량은 그 반대로 증가되었다. GSH/GSSG비도 GSH와 비슷한 경향이었으며, STZ-400ES군이 가장 높았다. 혈청 GOT와 GPT 활성은 대조군에 비해 당뇨 유발된 STZ-40E군에서 약 10%, 30%씩 각각 증가되었으나 STZ-0E군에서는 각각 2.3배, 3.9배 증가되었다. 그러나 STZ-400E, STZ-400ES군은 증가되지 않았다. 간조직중의 지질과산화가는 STZ-0E군과 STZ-40E군이 대조군보다 5.6, 2.5배씩 높았으나 STZ-400E, STZ-400ES군은 유의적인 차이가 없었다.

이상의 결과에서 STZ유발 당뇨쥐는 지질 과산화 반응이 정상군에 비해 촉진되었으며, 식이중 공급되는 비타민 E 함량이 부족시는 더욱 가속화되었다. 그러나 식이중 비타민 E와 Se의 각각 급여때 보다는 동시 급여시는 생체내 황산화계 효소들이 더욱 활성화되고, 생리적 항산화물질이 증가되었다. 따라서 적절한 식이비타민 E와 Se은 당뇨병으로 인한 지질과산화에 대한 항산화적 방어기구를 강화시키므로써 조직의 과산화적 손상을 완화시키는데 크게 기여함을 알 수 있었다.

Literature cited

- 1) 최원경. Streptozotocin유발 당뇨쥐에 있어서 항산화적 방어기구 및 metallothionein합성에 미치는 비타민 E의 영향. 효성여자대학교 박사학위논문, 1994
- 2) Bompart GJ, Prevot DS, Bascands JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity : Application to cisplatin-induced toxicity, *Clin Biochem* 23 : 501-504, 1990
- 3) Adams JJD, Lauerburg BH, Mitchell JR. Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat : Regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 227(3) : 749-753, 1983
- 4) Patil GS, Cornwell DG. Intergradiol oxidation of α -tocopherol and the surface properties of its oxidation products. *J Lipid Res* 19 : 416-422, 1978
- 5) 이순재 · 최원경. 가열유와 vitamin E가 흰쥐 간장내의 과산화적 손상에 미치는 영향. *한국영양학회지* 20(2) : 111-120, 1991
- 6) 박미향 · 이순재. Cadmium투여 흰쥐 뇌조직의 과산화적 손상과 황산화계에 미치는 식이 selenium의 투여기간별 영향. *한국노화학회지* 4(1) : 14-19, 1994
- 7) Panganamala RV, Cornwell DG. The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann NY Acad Sci* 393 : 376-393, 1982
- 8) 이순재 · 박규영 · 김관유. 식이 vitamin E와 selenium이 납중독된 흰쥐에 있어서 조혈작용과 항산화적 해독기구에 미치는 영향. *한국영양학회지* 22(6) : 651-657, 1993
- 9) 백태홍 · 전세열 · 김천호. 영양학 실험. 수확사 pp35-36, 1984
- 10) Desbuquois B, Aurbach GB. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 33 : 732-738, 1971
- 11) Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28 : 56-63, 1957
- 12) Stripe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244(14) : 3855-3863, 1969
- 13) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47 : 469-474, 1974
- 14) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71 : 952-958, 1976
- 15) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase : the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139, 1974
- 16) Bernt E, Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis : Glutathione. *2nd English Ed Academic Press* 4 : 1641, 1974
- 17) Kayden HJ, Chow CK, Bjornson LK. Spectrophotometric method for determination of α -tocopherol in red cell. *J Lipid Res* 14 : 553-540, 1973
- 18) Hawk PB, Oser BL, Summerson WH. Ferric chloride dipyrindyl method(Emmenrie-Engel reaction). practical Phsio Chem 13th ed. *JLA Churchill LTD* 1272-1273, 1956
- 19) Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chemica Acta* 90 : 37-43, 1978
- 20) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177 : 751-766, 1949
- 21) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 22) Higuchi Y. Lipid peroxides and α -tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Med Okayama* 36(3) : 165-175, 1982
- 23) Craft NE, Failla ML. Zinc, iron and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol* 244 : E122-E 128, 1983
- 24) William B. Kannel, MD, Daniel, L.McGee, PhD : Diabetes and cardiovascular disease. *JAMA*, May, 11 241(19), 1979
- 25) Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med* 36 : 429-451, 1985
- 26) Morel DW, Chisolm GM. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 30 : 1827-1834, 1989
- 27) Ziegler DW, Hutchison HD, Kissling RE. Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice. *Infection and Immunity* 3(2) : 237, 1971
- 28) Urano S, Midori HH, Tochihi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26(1) : 58-61, 1991
- 29) Prichard KA, Patel ST, Karper CW, Newman HAI, Panganamala RV. Triglyceride-lowering effects of dietary vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. *In-*

creased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes* 35 : 278-281, 1986

30) Matkovics B, Varga SI, Szabo I, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism en-

zyme. *Horm Metab Res* 14 : 77-79, 1982

31) Raymond FB. Recent developments in trace element metabolism and function : New roles of selenium in nutrition. *J Nutr* 119 : 1051-1054, 1989