

[報 文]

Alloxan 유도 당뇨병상태에서 과산화지질생성에 미치는 Brazilin의 효과

안영수 · 김이룡 · 소동수 · 창동신
김진형 · 박광식* · 문창규[†]

서울대학교 약학대학, *국립환경연구원

Antilipidperoxidative Effects of Brazilin in Alloxan-induced Diabetic Mice

Young-Su An, Lee-Yong Khil, Dhong-Su So, Tong-Shin Chang, Jin-Hyoung Kim,
Kwang Sik Park* and Chang-Kiu Moon[†]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
*National Institute of Environmental Research

ABSTRACT

Brazilin was tested for its ability to inhibit alloxan induced lipidperoxidation. Lipid peroxide contents in liver, kidney and serum were measured by the TBA method. ICR mice receiving alloxan at a dose of 43mg/kg via the tail vein after a 24hrs starvation showed significantly increased lipid peroxide contents as compared to untreated control. Lipid peroxide contents in liver, kidney and serum of alloxan-induced diabetic mice were dose-dependently decreased by the treatment of brazilin at a dose of 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg for 5 days.

Key words : Brazilin, Lipid peroxidation, Alloxan, Diabetes

서 론

과산화지질은 불포화지방산이 free radical로 활성화되어 산소와 반응하여 형성되는데 생체 내에서 과산화현상은 mitochondria, microsome, 적혈구, 혈소판 등의 생체막에서 주로 일어난다.^{1, 2)} 과산화지질은 비효소적반응으로 radiation (X-ray, ultraviolet,

visible, ionizing)³⁾ 및 전이금속⁴⁾ 등에 의해서 생성되고 효소적반응으로 전이금속과 함께 NADPH-Cytochrome P-450 reductase와 Cytochrome P-450 system⁵⁾에 의해서 대사적으로 활성화된 free radical을 통해서 생성되는데 이것은 체내의 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxidase 및 항산화제에 의해서 생산이 억제되거나

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로 (전화) 02-880-7843 (팩스) 02-884-4580

hydroxy acid 등으로 분해된다.⁶⁾ 체내의 과산화지질은 여러 가지 중요한 병적 상태에 영향을 미친다. 급성간염,⁷⁾ alcohol성 지방간,⁸⁾ CCl₄⁹⁾에 의해 간조직중 과산화지질량이 증가하는 것으로 보고되어있다. 심근경색, 뇌경색, 뇌출혈 등의 경우에도 혈관장애에 의해서 과산화지질이 증가하고 간질성 폐렴, 만성관절염 류마티즘,¹⁰⁾ 피부병 및 당뇨병 질환의 경우에도 과산화지질이 높게 검출되어 지질과산화반응이 이와 같은 병태에 중요한 영향을 주고 있음을 시사하고 있다. 뿐만 아니라 과산화지질은 세포의 노화의 주요인으로 작용하며 혈중의 각종 효소, lipoprotein을 변성시킨다.

Brazilin은 생체내 지질과산화 현상과 밀접한 관련이 있는 건조지방에 대한 항산화활성, 자발성 고혈압 쥐에 있어서 지질대사 개선,¹¹⁾ 간독성 보호작용¹²⁾ 및 혈소판 응집 억제작용¹³⁾ 등이 있다. 본 실험에서는 여러 가지 중요한 병적 상태와 밀접한 관련이 있는 과산화지질의 생성 또는 축적에 대한 brazilin의 작용을 알아보기 위해서 alloxan을 ICR mice에 정맥주사해 당뇨병과 함께 과산화지질을 유도한 후 brazilin처리에 의해서 변화된 과산화지질량을 간, 신장 및 혈중에서 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 mice는 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 분양 받아 최소 2주간 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 삼양유지 사료사의 mouse 및 rat용 사료를 사용하였고 물과 사료는 제한하지 않았다.

2. Alloxan 당뇨병의 유도

ICR mice (male, 20±2g)를 24시간 절식시킨 후 생리식염수에 alloxan을 녹여 43mg/kg 용량으로 정맥 주사하였으며, 정상대조군은 동량의 생리식염수를 주사하였다. Alloxan 투여 72시간후 혈당을 검사하고 혈당치가 450~600mg/ml되는 mice를 실험에 사용하였다.

3. 시료의 투여

실험동물을 정상대조군, 당뇨대조군과 당뇨 brazilin처리군으로 구분하여 5일간 brazilin 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg의 용량별로 투여하였고 정상대조군 및 당뇨 대조군에는 시험군의 투여 시료의 량과

동량의 생리식염수를 투여하였다.

4. 간 및 신장 homogenate에서의 과산화지질 측정

약물 투여 24시간후 채혈하고 간과 신장을 신속히 적출하였다. 적출한 간에 1/20M phosphate buffer (pH 7.4) 7ml (신장의 경우 2ml)를 가하고 homogenation시켜 마개있는 시험관에 0.5ml씩 취하였다. 여기에 7% sodium dodecyl sulfate (SDS)용액 0.4ml를 가하여 37°C에서 30분간 incubation시키고 1N HCl 2ml과 1%TBA 1ml를 가한 후 95°C 수욕상에서 50분간 가온한 후 즉시 급냉시켜 butanol 5ml로 추출하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 535nm에서 UV흡광도를 측정하였다.

5. 혈장 과산화지질의 측정

약물 투여 24시간후 채혈하여 3000 rpm으로 10분간 원심분리시켜 상층을 20ul씩 취하였다. 여기에 1/12N H₂SO₄ 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5ml를 가하고 실온에서 5분간 방치하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 얻은 침전을 1/12N H₂SO₄ 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.3ml를 가하여 혼합하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층을 버리고 침전을 얻었다. 여기에 증류수 4ml을 넣어 vortex mixer로 잘 현탁시켜 0.67% TBA 시약 (동량의 acetic acid 혼합 시약) 1ml를 넣고 95°C 수욕상에서 50분간 반응시킨 후 얼음물에 신속히 냉각시켜 n-butanol 5ml로 추출하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 excitation 535nm, emission 553nm에서 형광을 측정하였다.

혈장의 과산화지질량은 아래와 같이 구하였다.

$$\text{과산화지질량(MDA)} = \frac{(0.5 \text{ nmole} \cdot f / F \cdot 1 / 0.02)}{1 \text{ ml혈액}}$$

f : 시료 형광 감도
F : 표준물질의 형광 감도

6. 간 및 신장 homogenate에서 단백질량

단백질량은 표준품을 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 법¹⁴⁾에 준하여 실시하였다.

7. 통계처리

모든 자료는 평균±표준 오차로 나타내었다. 유의성 검정은 각 군에 대하여 Student t-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

alloxan은 체내에서 효소적 또는 비효소적으로 분해되어 free radical을 형성하여 체장의 세포를 파괴함으로써 당뇨병을 유발하고,¹⁵⁾ 불포화지방이 많은 생체막에서 쉽게 지질과산화를 일으킨다.¹⁶⁾ 지질과산화는 CCl₄,⁹⁾ ethanol,¹⁷⁾ paraquat¹⁸⁾ 등 다수의 환경오염물질, 식품첨가물, 약제에 의해서 유도되지만 본 실험에서는 당뇨병상태에서의 과산화지질의 생성에 대한 brazilin의 억제능을 알아보기 위해서 alloxan을 지질과산화 유도제로 사용하였다.

간에서 과산화지질의 생성에 미치는 brazilin의 영향은 Table 1에 표시하였다. 정상대조군에 비하여 alloxan처리군은 과산화지질의 생성이 24% 증가했으며 brazilin을 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg을 5일간 투여하였을 때 용량 의존적으로 과산화지질의 양이 감소했으며 100 mg/kg투여군에서는 정상대조군의 수준으로 감소되었다.

신장에서 과산화지질의 생성에 미치는 brazilin의 영향은 Table 2에 표시하였다. Alloxan을 처리함으

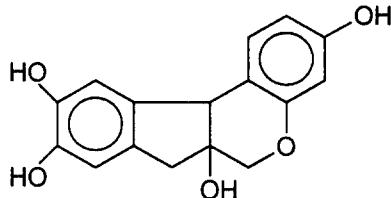


Fig. 1. Structure of Brazilin.

Table 1. Antilipidperoxidative Effects of Brazilin in Mice Liver.

Group	N	MDA contents in liver (nmole/mg protein)	% of control
Normal Control	6	0.698 ± 0.027	
Alloxan treated	6	0.868 ± 0.073*	124
Alloxan-Brazilin treated (10mg/kg)	5	0.852 ± 0.119	122
Alloxan-Brazilin treated (50mg/kg)	5	0.757 ± 0.029*	108
Alloxan-Brazilin treated (100mg/kg)	5	0.649 ± 0.116*	93

Values are expressed as mean ± SE
 * : p < 0.01 compared with control group
 * : p < 0.05 compared with alloxan-treated group

Table 2. Antilipidperoxidative Effects of Brazilin in Mice Kidney.

Group	N	MDA contents in kidney (nmole/mg protein)	% of control
Normal Control	6	0.939 ± 0.065	
Alloxan treated	6	1.536 ± 0.157	163
Alloxan-Brazilin treated (10mg/kg)	5	1.104 ± 0.217*	117
Alloxan-Brazilin treated (50mg/kg)	5	0.984 ± 0.062**	104
Alloxan-Brazilin treated (100mg/kg)	5	1.025 ± 0.237*	109

Values are expressed as mean ± SE
 * : p < 0.01 compared with control group
 * : p < 0.05 compared with alloxan-treated group
 ** : p < 0.01 compared with alloxan-treated group

Table 3. Antilipidperoxidative Effects of Brazilin in Mice Serum.

Group	N	MDA contents in serum (nmole/mg blood)	% of control
Normal Control	6	1.64 ± 0.20	
Alloxan treated	6	2.06 ± 0.23	125
Alloxan-Brazilin treated (10mg/kg)	5	1.83 ± 0.20*	111
Alloxan-Brazilin treated (50mg/kg)	5	1.74 ± 0.28	106
Alloxan-Brazilin treated (100mg/kg)	5	1.50 ± 0.31*	91

Values are expressed as mean ± SE
 * : p < 0.05 compared with control group
 * : p < 0.05 compared with alloxan-treated group

로써 과산화지질의 함량은 정상군에 비해서 63% 증가했으며 brazilin을 투여한 모든 군에서 거의 정상적인 수준까지 감소되었다.

과산화지질의 생성이 간에서보다 신장에서 더욱 크게 증가하였는데 이것은 alloxan투여에 의해서 신장에서는 acylCoA synthetase, d-6-desaturase¹⁹⁾ 활성이 증가되어 불포화지방산이 증가하는 반면 간에서는 d-6-desaturase, d-9-desaturase²⁰⁾의 활성감소와 arachidonic acid생성이 감소되는 등의 지질의 조성 및 대사에 있어서 차이를 보이기 때문으로 생각되며 또한 신장에서는 alloxan투여 후 4일 후부터 원위세뇨관의 결함이 생겨 과산화지질의 생성이 증가하는 것으로 생각된다.²⁰⁾

혈장에서 과산화지질의 생성에 미치는 brazilin의 영향은 Table 3에 나타내었다. alloxan을 처리함으로써 과산화지질의 생성은 정상군에 비해서 25% 증가했으며 brazilin투여군에서는 과산화지질의 함량이 감소하는 경향을 보여주고 있다.

Alloxan투여에 의해서 과산화지질의 함량은 신장에서 가장 컸으며 간 및 혈장에서는 비슷한 수준이었으며 brazilin을 처리시 그 함량의 변화도 유사한 경향을 보이고 있다. 이는 혈중의 과산화지질은 주로 간의 과산화지질에 의해서 지배됨을 시사해주고 있다.

본 실험에서 확인된 brazilin의 지질과산화 억제 작용은 그 기전이 BHA처럼 phenols²¹⁾ 부분이 hydroxy radical과 반응한 후 공명체 의해서 안정화시키는 free radical scavenger으로써 작용하거나, vitamin E와 같은 항산화제²²⁾처럼 superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxide 등을 활성화시키거나, 당뇨병성 지질대사의 이상²³⁾을 개선함으로써 지질과산화를 억제하는지 또 이들 인자들의 조합에 의한 것인지는 차후실험에 의해 밝혀져야 할 부분이다.

결 론

1. Alloxan 당뇨병상태에서의 과산화지질생성에 미치는 brazilin의 영향을 검토하였다.
2. Alloxan 당뇨병상태에서 유도된 과산화지질함량은 간과 혈장에서보다 신장에서 가장 높은 것으로 관찰되었다.
3. Brazilin은 alloxan 당뇨병상태에서 유도되는 지질과산화를 간, 혈장 및 신장의 모든 검체에서 용량 의존적으로 억제하는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., Vercesi, A.E., Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca⁺⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2929-34 (1996)
2. Riedl, A., Anderton, M., Shamsi, Z., Goldfarb, P., Wiseman, A., Structural modulation of lipid peroxidation by the proteins within membranes: model protein studies with liposomes. *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 251S (1995)
3. Schmitz, S., Thomas, P.D., Allen, T.M., Poznansky, M.J., Jimbow, K., Dual role of melamins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation. *Photochem Photobiol.*, **61**, 650-5 (1995)
4. Tien, M., Morehouse, L.A., Bucher, J.R., Aust, S.D., The multiple effects of ethylenediaminetetraacetate in several model lipid peroxidation systems. *Arch. Biochim. Biophys.*, **218**, 450-8 (1982)
5. Yang, M.X., Cederbaum, A.I., Role of cytochrome b5 in NADH-dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation, and hydrogen peroxide generation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**, 282-92 (1995)
6. Wendel, A., Feuerstein, S., Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. pharmacol.*, **30**, 2513-20 (1981)
7. Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., Yagi, K., Serum lipoperoxide level in patients suffering from liver diseases. *Clin. chim. Acta.*, **79**, 267-70 (1977)
8. Cederbaum, A.I., Becker, F.F., Rubin, E., Ethanol metabolism by a transplantable hepatocellular carcinoma. Role of microsomes and mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5366-74 (1976)
9. Azri, S., Mata, H.P., Gandolfi, A.J., Brendel, K., CCl₄-induced cytochrome P-450 loss and lipid peroxidation in rat liver slices. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **283**, 669-74 (1991)
10. Bevez, V.P., Panchishina, M.V., Age-related blood lipid levels in healthy persons and rheumatism patients. *Vopr. Revm.*, **2**, 59-61 (1981)
11. Moon, C.K., Lee, S.H., Lee, M.O., Kim, S.G., Effects of Brazilin on glucose oxidation, lipogenesis and therein involved enzymes in adipose tissues from diabetic KK-mice. *Life Sci.*, **53**, 1291-7 (1993)
12. Moon, C.K., Park, K.S., Kim, S.G., Won, H.S., Chung, J.H., Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl₃-induced toxicity. *Drug Chem. Toxicol.*, **15**, 81-91 (1992)
13. Moon, C.K., Chung, J.H., Chung, S.Y., Kim, J.Y., Inhibition of Platelet Aggregation with

- Hematoxylin in Normal and Experimental Diabetic Rats. *Toxicologist*, **10**, 57 (1990)
14. Peterson G.L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**, 346-356 (1977)
 15. Mrozikiewicz, A., Kielczewska-Mrozikiewicz, D., Lowicki, Z., Chmara, E., Korzeniowska, K., Mrozikiewicz, P.M., Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol.*, **31**, 236-7 (1994)
 16. Soto, C., Muriel, P., Reyes, J.L., Pancreatic lipid peroxidation in alloxan-induced diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.*, **25**, 377-80 (1994)
 17. Cederbaum, A.I., Organic hydroperoxide-dependent oxidation of ethanol by microsomes: lack of a role for free hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **227**, 329-38 (1983)
 18. Yamada, K., Fukushima, T., Mechanism of cytotoxicity of paraquat. II. Organ specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **45**, 375-80 (1993)
 19. Clark, D.L., Queener, S.F., Effects of diabetes mellitus on renal fatty acid activation and desaturation. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 4305-10 (1985)
 20. Gellhorn, A., Benjamin, W., The effect of insulin on monounsaturated fatty acid synthesis in diabetic rats. The stability of the informational RNA and of the enzyme system concerned with fatty acid desaturation. *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 460-6 (1966)
 21. Noller, C.R., Chemistry of organic compounds, 3rd Edn. (Philadelphia) p.561 (1966)
 22. Liebler, D.C., Burr, J.A., Antioxidant stoichiometry and the oxidative fate of vitamin E in peroxy radical scavenging reactions. *Lipids*, **30**, 789-93 (1995)
 23. Woods, J.A., Knauer, T.E., Lamb, R.G., The acute effects of streptozotocin-induced diabetes on rat liver glycerolipid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **666**, 482-92 (1981)