

Zinc 투여가 Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 항산화효소계와 Metallothionein 합성에 미치는 영향

최원경[†] · 이순재^{*}

김천전문대학 식품영양과

^{*}대구효성가톨릭대학교 식품영양학과

Effects of Zinc on the Antioxidative Enzymatic System and Metallothionein Synthesis in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Won-Kyung Choe[†] and Soon-Jae Rhee^{*}

Dept. of Food Science and Nutrition, Kimchun Junior College, Kimchun 740-200, Korea

^{*}Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu Hyosung, Hayang 712-702, Korea

Abstract

The present study was carried out to investigate the effects of zinc and vitamin E on the antioxidative defense mechanism in the liver of streptozotocin(STZ)-induced diabetic rats. Levels of blood glucose of STZ-diabetic rats were higher than that of control, but ZDM(ZnSO₄ 10mg/kg injection + STZ) group was lower than those of DM(STZ injection) and EDM(vitamin E 400mg/kg diet + STZ) group. Levels of plasma insulin were lower in all three STZ-diabetic groups than those of control. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) peroxide values(LPO) in liver were increased 2.3-fold in DM group compared with those of control, while LPO in ZDM group was lower than that of DM group, and EDM group had similar tendency compared with that of control. Reduced glutathione(GSH) contents of liver were decreased in DM group compared with those of control, but increased 2.3, 1.7-fold in ZDM and EDM groups, respectively, compared with those of DM group. Oxidized glutathione(GSSG) was increased in DM group compared with control and GSSG in ZDM and EDM group were lower than that of DM group. GSH/GSSG ratio had similar tendency compared with results of GSH. The activities of free radical scavenging enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase were significantly decreased in DM group compared to those of control, but higher in ZDM and EDM groups than those of DM group. The metallothionein contents in liver and kidney were increased in DM and EDM groups were remarkably increased 20, 5.3-fold in ZDM group, compared with those of control.

Key words: diabetic rats, lipid peroxidation, zinc, metallothionein

서 론

많은 퇴행성 질환들 즉, 동맥경화, 암, 염증반응, 노인성 치매, 퇴행성 안질환 등은 free radical 반응에 의해 발생한다는 것이 최근의 지배적인 이론이다(1). 대부분의 free radical(singlet oxygen, hydrogen peroxide 포함) 들은 세포막의 지질과산화물을 촉진하는 것에서부터 병리기전이 출발된다. 당뇨병 환자에서도 free radical 생성계가 촉진되어 간조직이나 심장근육 및 혈청에서의 지질과산화도가 높아 뇌졸중이나 심근경색과 같은 심혈관계질환을 일으키기 쉽다고 한다. 따라서 당뇨병환

자에게서 오는 여러 합병증은 free radical 생성에 의한 지질과산화와 관련이 깊다고 볼 수 있다. 생체내에는 이러한 free radical을 제거해 주는 scavenger들이 있는데 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione S-transferase(GST) 등의 항산화효소(2,3)와 glutathione(GSH), 비타민 E, C, β -carotene, Se(4,5) 그리고 잘 알려져 있지는 않으나 zinc와 같은 미량금속(6)과 metallothionein(7) 등의 비효소적 scavenger들이 있다. 미량금속들은 많은 대사 경로에 있어서 효소의 보조인자로서 그 기능을 하기때문에 스트레스 상태에 대해 생화학적 적응으로서 hepatic

[†]To whom all correspondence should be addressed

cytosol에 있는 zinc와 copper의 함량이 증가한다(8). 간과 신장조직은 미량금속대사의 단기간 조절기능을 가지고 있는 것은 이미 알려진 사실이다. 고단위 금속이 포함된 식이를 투여하였거나 금속염을 비경구적으로 투여하였을 때나(9) 스트레스 등(10)과 같은 생리적인 요인들에 의하여 간과 신장에서 cytosol zinc와 copper의 농도가 증가하며 이것은 metallothionein(MT)의 생합성과 관련이 있는 것을 알 수 있다(11). Failla(8)에 의하면 STZ투여한 인슐린결핍 당뇨병의 간에서 cytosol zinc 농도가 현저하게 증가되었다고 보고하였고, Failla와 Kizer(12)는 췌장과 부신피로몬 수준의 급격한 변화에 의해 간에서의 이러한 미량금속대사가 영향을 받는다고 하였으며, 이러한 변화는 결국 zinc, copper와 결합된 metallothionein수준을 증가시켰다고 볼 수 있다. Thomas 등(13)이 제시하기를 zinc는 그 자체가 항산화제의 특성을 가지고 있어 세포막에 작용하여 불포화지방산의 산화를 방해한다고 하였으며, Zn-MT의 생리적 기능이 확실히 알려진 바는 아니지만 thiolate clusters를 가지고 있으므로 hydroxy radical과 superoxide의 유능한 방해자로서 작용한다는 몇몇 보고들(14,15)로 미루어 Zn-MT는 항산화기능을 가졌을지도 모른다고 제안할 수 있다.

이와 같은 점에서 산화적 스트레스에 민감한 당뇨병에 있어서, 첫째 활성산소에 의한 지질과산화와 이에 따른 과산화적 손상정도를 파악하고, 둘째 이를 방어할 수 있는 항산화기구를 강화시키는 물질인 zinc와 Zn-MT의 항산화적 역할을 확인하기 위한 연구가 되어야 한다고 생각한다. 따라서 본 연구에서는 당뇨병에 의해 증가된 활성산소를 zinc와 Zn-MT가 제거해 준다는 가능성을 확인하고자 강력한 항산화제로 알려진 비타민 E투여와 함께 zinc를 비경구적으로 투여하여 일정기간 사육한 후 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시켜 간조직의 과산화적 손상정도와 조직의 과산화로부터 항산화 방어계를 측정하고, 간 그리고 신장조직의 MT 함량 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육

실험동물은 체중 120g 내외의 Sprague-Dawley종 숫컷을 대전 화학연구소에서 구입하여 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반배합사료(제일사료주식회사)로 일주일간 예비사육한 후 난괴법(randomized complet block design)에 의해 Table 1과 같이 대조군과 실험군으로 나눈 후 실험군을 다시 정상식이를 공급하고 당뇨병 유발한 군(DM), 정상식이를

Table 1. Classification of experimental groups

Groups	Vitamin E (mg/kg diet)	ZnSO ₄ ⁻ (mg/kg B.W)	STZ ¹⁾ injection
Control	40		-
DM	40		+
ZDM	40	10	+
EDM	400		+

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

⁻ Intraperitoneal injection of ZnSO₄ in a single dose

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's(16)

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, 35mg; ZnCl₂, 25mg; CoCl₂ · 5H₂O, 5mg; (NH₄)₆ · Mo₇O₂₄ · 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)

공급하고 당뇨병발전 ZnSO₄(10mg/kg)를 투여한 군(ZDM), 비타민 E를 다량 급여한 군(400mg/kg diet) 투여한 군(EDM)등 각 10마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 기본 실험 식이조성은 Table 2와 같다.

당뇨유발

실험동물을 희생하기 4일전에 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.

혈액 및 장기채취

실험 종료 후 실험동물들을 ether 마취하에서 복부대동맥으로 채혈하여 heparin으로 처리한 혈액의 일정량과 heparin으로 처리하지 않은 혈액을 각각 따로 취하여 실온에서 30분간 방치한 후 1500g에서 각각 15분간씩 원심분리하여 혈청과 혈장을 얻었다. 혈청은 glucose 측정용으로, 혈장은 insulin, cortisol 측정용으로 각각 사용하였다. 그리고 간장 및 신장은 적출하여 생리식염수로 씻어내고 무게를 측정한 후 액체질소로 급동결시켜 -80°C 에 보관하였다.

Blood glucose와 혈장 insulin

Blood glucose는 아산제약의 혈당 측정용 kit를 사용하여 측정하였고, Plasma insulin은 Radioimmunoassay법(17)에 따라 Insulin RIABEAD II Kit(Abbott)를 사용하여 측정하였다.

간조직중의 과산화지질(TBARS)측정

간조직중의 LPO정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satoh(18) 방법을 이용하였다. 각효소의 단백질정량은 Lowry법(19)을 이용하여 정량하였다.

간조직중의 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) 및 glutathione S-transferase(GST) 활성 측정

간조직의 SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund(20)의 방법에 따라 측정하였으며, GSH-Px 활성은 산화형 glutathione(GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 340nm에서 NADPH의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 Lawrence 및 Burk(21)의 방법에 따라 측정하였다. 그리고 GST 활성 측정은 2,4-dinitrochloro-benzene(DNCB)과 환원형 glutathione을 기질로 하여 25°C 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 Habig 등(22)의 법에 의하여 측정하였고, 이 효소활성의 단위는 1분간 1mg의 단백질이 반응하여 생성한 conjugated DNCB를 nmol로 나타내었다.

간조직중의 glutathione 농도 측정

Glutathione의 농도 측정은 Bernt와 Bergmeyer(23)의 방법에 따라서 실시하였다. 즉 간조직에 1M perchloric acid 3ml를 가하여 산추출물을 얻고 이 산추출액으로부터 4M K_2CO_3 로 중화하여 산화형 glutathione(GSSG)은 glutathione reductase 반응을 이용하였으며, 이 반응에서 소모된 NADPH량을 340nm에서 측정하여 정량하였으며, 환원형 glutathione(GSH)은 glyoxalase반응을 이용하여 생성된 S-lactosyl-GSH를 240nm에서 측정하여 정량하였다.

간장과 신장 조직의 total metallothionein(MT) 함량 측정

간장과 신장 조직의 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 105,000×g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 cytosol에서 Hidalgo 등(24)의 방법에 의하여 total MT를 측정하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

Blood glucose 함량과 혈장 insulin 수준

당뇨유발과 그 정도를 관찰하기 위하여 희생하기 전 6시간 절식시킨 후 혈당량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 모든 당뇨병유발 실험군이 대조군에 비해 약 2.5배 이상 혈당량이 높았으며, ZDM군이 DM군에 비해 약간 낮은 경향이였다. 혈장 insulin은 대조군에 비해 당뇨병 유발군 모두 20%, 16%, 22%씩 각각 감소하였으며, 당뇨병유발군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

혈청중 glucose 함량을 측정한 결과는 대조군에 비해 당뇨병유발군에서 모두 심한 고혈당현상이 초래되는 데 이는 STZ이 췌장소도의 β 세포를 손상함으로써 insulin분비가 감소되고 따라서 당질 및 기타 대사 이상으로 인해 고혈당이 발생하는 것으로 알려졌다(25). Zinc를

Table 3. Effect of zinc pretreatment on blood glucose levels and plasma insulin levels in STZ-induced diabetic rats

Groups	Blood glucose	Insulin
	(mg/dl)	(μ U/ml)
Control	133.91 \pm 4.70 ^a	23.73 \pm 1.02 ^a
DM	443.72 \pm 37.60 ^b	16.58 \pm 0.62 ^b
ZDM	336.15 \pm 38.99 ^b	18.56 \pm 0.97 ^b
EDM	421.06 \pm 9.35 ^b	17.88 \pm 1.61 ^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

투여한 ZDM군은 DM군에 비해 다소 혈당이 감소한 것은 zinc가 insulin의 생리적 기능을 다소 증가시켜줄 수 있다는 가능성을 시사해 주는 것으로 사료되며 이러한 결과는 Yang과 Cherian(7)의 결과와도 일치하였다. 그러나 비타민 E 투여의 영향은 관찰되지 않았는데 이는 STZ에 의해 유발된 당뇨병쥐에서 비타민 E는 insulin수준과 glucose 함량에 영향을 미치지 않았다는 Prichard 등(26)의 연구결과와도 일치하였고 전보(27)에서도 이미 밝힌 바 있다.

간조직중의 과산화지질 함량

생체조직의 과산화적 손상의 지표로 알려져 있는 TBARS 생성량을 측정한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 DM군은 2.3배 높았고 ZDM군은 DM군에 비해 22% 낮아졌으며 EDM군은 대조군과 비슷하였다.

이와 같이 STZ 유발당뇨군에서 지질과산화물 함량이 증가하는 것은 생체막지질에서 PLA₂의 활성증가로 arachidonic acid cascade가 항진되어 활성산소생성이 증가된 것에 기인한다고 생각된다(28). 식이 비타민 E 투여로 지질과산화물값이 현저하게 감소하였는데 이는 비타민 E가 arachidonic acid 대사가 항진되는 것을 제어하여 활성산소의 생성을 억제시킨 것이라 보는데 이런 결과는 Prichard 등(26)의 주장과도 일치하였다. Zinc 투여한 STZ 당뇨병쥐에서도 지질과산화물 생성이 어느정도 감소한 것은 비타민 E의 효과만큼 강력한 항산화력은 없지만 Zn-SOD의 과산화물생성 억제효과와 함께 zinc는 세포막에 작용하여 산화가 진행되는 것을 촉매하는 iron이 세포막에 결합되는 것을 방해함으로써 지질과산화의 진행을 저해하는 것으로 사료되는데(14) 이는 IDDM환자에게 zinc를 경구투여하여 지질과산화를 관찰한 Faure 등(6)의 결과와 일치하였다.

Table 4. Effect of zinc pretreatment on liver lipid peroxide value in STZ-induced diabetic rats

Groups	TBARS
	MDA(nmol/mg protein)
Control	3.46 \pm 0.31 ^a
DM	8.55 \pm 0.93 ^b
ZDM	5.30 \pm 0.41 ^c
EDM	2.52 \pm 0.19 ^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

Table 5. Effect of zinc pretreatment on liver glutathione contents in STZ-induced diabetic rats
(μ mol/g wet tissue)

Groups	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Control	5.42 \pm 0.33 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a	34.32 \pm 3.25 ^a
DM	2.64 \pm 0.42 ^b	0.32 \pm 0.03 ^b	9.95 \pm 1.95 ^b
ZDM	6.13 \pm 0.21 ^a	0.22 \pm 0.02 ^c	31.01 \pm 3.52 ^a
EDM	4.38 \pm 0.29 ^c	0.22 \pm 0.01 ^c	19.93 \pm 0.64 ^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

간조직중의 glutathione 함량

비효소적 방어기구중의 또 다른 하나인 간조직중의 환원형 glutathione(GSH) 함량은(Table 5) 대조군에 비해 DM군은 51% 감소되었으나 ZDM과 EDM군은 DM군에 비해 각각 2.3배, 1.7배 증가되었다. 산화형 glutathione(GSSG) 함량은 그 반대로 대조군에 비해 DM군이 46.9% 증가, DM군에 비해 ZDM군과 EDM군은 모두 31.3% 감소되었다. 따라서 GSH/GSSG 비율은 대조군에 비해 DM, ZDM 및 EDM군이 각각 71%, 9.7%, 41.9%씩 감소되었다. STZ 당뇨병쥐에서 GSH 함량이 급격히 감소한 것은 지질과산화물에 의한 것으로 사료되며 이는 STZ 당뇨병쥐에서 조직의 항산화상태를 관찰한 Thompson 등(28)의 결과와 일치하였고, 비타민 E 투여보다 오히려 zinc 투여로 인해 GSH 함량이 증가한 것은 zinc가 강력한 항산화역할을 가진다고 할 수 있다.

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

간조직에서 항산화 효소활성을 측정한 결과는 Table 6과 같다. SOD활성은 대조군에 비해 DM군은 유의적으로 감소되었으나 ZDM, EDM군은 DM군에 비해 대조군 수준으로 증가되었다. GSH-Px활성은 대조군에

Table 6. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver tissue of STZ-induced diabetic rats

Groups	SOD	GSH-Px	GST
	(Unit/mg protein)	(nmol NADPH/min/mg protein)	(nmol DNCB/mg protein/min)
Control	3.56±0.05 ^a	274.61± 9.81 ^a	501.27±28.66 ^a
DM	3.20±0.06 ^b	188.03±15.61 ^b	401.75± 8.43 ^b
ZDM	3.52±0.10 ^a	264.18±20.52 ^{ac}	561.82±15.98 ^a
EDM	3.48±0.09 ^a	311.90±14.25 ^c	653.57±33.29 ^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

비해 DM군은 31.5% 감소되었으나 ZDM, EDM군은 DM군에 비해 각각 40.5%, 65.9%씩 증가되었고 GST 활성은 GSH-Px의 결과처럼 DM군은 대조군에 비해 19.9% 감소되었으나 ZDM, EDM군은 DM군에 비해 39.8%, 62.7%씩 증가되었다. 이와 같이 DM군에서 superoxide anion에 특이적으로 작용하는 SOD활성이 감소한 것은 STZ주사로 인해 superoxide anion 발생이 많은데 cytoplasmic SOD는 Zn와 Cu 의존성이 대부분이므로 STZ주사에 의해 SOD를 구성하는 Zn가 부족하게 되므로 그 활성이 감소한 것으로 사료되며, 이와 같은 결과는 여러 연구(6,7,28)에서 찾아볼 수 있다. 따라서 Zn가 SOD의 보조인자로써 작용하므로 Zn 투여가 SOD활성을 증가시켰다고 본다. 그리고 hydrogen peroxide에 대해 특이적으로 반응하는 항산화효소인 GSH-Px와 변이원성물질, 독성물질 등의 대사산물 그리고 내인성 독소들 중에서 친전자성 물질 등에 환원형 glutathione을 포함하여 glutathione thioester(R-S-G)를 형성하는 반응을 촉매하는 GST역시 STZ로 당뇨를 유발하므로써 활성이 감소하였는데, 이러한 현상은 당뇨상태에서는 불포화지방산 함량이 높은 생체막이 산화적 스트레스에 대해 민감하여 지질과산화이 일어나 이로 인해 효소활성에 필요한 세포소기관들의 과산화적 손상이 가속화되므로써 효소활성이 저하된 것으로 본다(26,29). 이것은 copper를 결핍시킨 STZ 당뇨쥐의 GST활성을 측정 한 McDermott 등(30)결과와 일치하였으며 zinc를 당뇨쥐에게 경구투여하였을 때 항산화효소활성이 증가한 Faure 등(6)결과와 일치하였다.

간장과 신장중의 metallothionein 함량

STZ로 유도된 당뇨쥐에 있어서 간장, 신장 조직에서의 metallothionein 함량에 대한 측정결과는 Table 7와 같다.

간장에서의 metallothionein 함량은 대조군에 비해 DM, EDM군은 각각 3.5배, 3.3배 증가하였고, ZDM군

은 20배로 현저히 증가하였다. 신장에서의 MT 함량은 대조군에 비해 DM, ZDM, EDM군은 2.0배, 5.3배, 2.2배씩 증가되었다. 당뇨군간의 간장중 metallothionein 함량을 비교하였을 때 DM군에 비해 EDM군은 별차이를 보이지 않았으나 ZDM군에서만 현저히 증가되었다.

STZ 유발당뇨쥐의 간과 신장에서 Zn-MT 함량이 증가한다는 최근의 몇몇 보고들(31,32)도 있듯이 MT 합성이 지질과산화와 관련이 있다고 볼 수 있다. 즉, 당뇨상태에서는 cytosolic Zn-MT 수준이 증가되는데 (7,8,10,12) 이것은 당뇨유발로 생성된 활성산소들을 제거하는 항산화역할로서 가능성을 시사하지만 확실한 기전은 아니라고 보고 되어있다(7). 활성산소들은 mitochondria의 전자전달계와 환원된 NADP oxidase의 반응에 의해 생성된다. 그러나 활성산소에 의한 조직의 손상을 방어해 주는 여러가지 방어계가 있는데 각각 특이적으로 작용하는 항산화효소가 있다. 즉, superoxide는 SOD, hydrogen peroxide는 catalase와 GSH-Px 등이다. 그렇지만 활성산소들중에서 조직손상에 가장 영향력이 큰 hydroxyl radicals에 대한 특이적인 방어계는 없다(7). Thornally 등(14)이 제시하기를 xanthine-xanthine oxidase 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical과 superoxide radical을 MT가 scavenge한다고 하였고, 또한 superoxide radical 보다 hydroxyl radical에 작용하는 MT량이 훨씬 더 많다고 하였는데 이

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

	(µg MT/g of wet tissue)	
	Liver	Kidney
Control	7.15±0.40 ^a	8.76±0.55 ^a
DM	25.32±2.23 ^b	17.70±1.05 ^b
ZDM	142.70±5.66 ^c	45.95±5.99 ^c
EDM	23.86±2.47 ^b	19.32±2.54 ^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

는 MT가 hydroxyl free radical에 대한 세포내 방어계로 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다. 본 연구에서는 간장에서 MT의 유도자로서 zinc를 사용하였는데, zinc 그 자체는 세포막의 안정성을 유지하는 것과 항산화제로서의 특성을 갖고 있다. Pattison과 Cousins (33)는 zinc, copper와 단백질의 binding현상은 zinc와 copper의 항상성을 유지하는 것이 목적이라 할 수 있다고 제안하였고, zinc는 carbonic anhydrase, alkaline phosphatase, aldolase 등의 보조인자로서 스트레스 동안 많은 metalloenzyme의 활성이 증가되는데 이것은 체내 방어기전에 있어서 MT의 역할로 추정할 수 있다. 또한 zinc투여로 inflammation 감소의 효과가 있다는 실험을 통해 MT 유도는 세포내 방어기전에 있어서 zinc와 그 protein의 역할을 반영할 수 있는데 즉, Zn-MT는 phagocytic activity의 효과가 있고(34) MT는 이러한 요소의 조절기능을 제공할 수가 있다고 사료된다. 본 연구의 결과로 미루어도 STZ 당뇨병쥐에 대한 항산화역할과 MT의 유도물질인 zinc의 역할을 확인할 수 있었다.

요 약

당뇨병쥐에 있어서 생체내 항산화방어계에 미치는 zinc투여의 영향을 관찰하기 위하여 비타민 E 투여군과 비교실험하였다. 혈당량은 당뇨군들이 대조군에 비해 현저히 증가되었으나 ZDM군이 DM과 EDM군에 비해 약간 감소되는 경향을 띠었다. 혈장 인슐린수준은 혈당량과 반대의 경향을 띠었다. 간조직중의 TBARS 측정량은 대조군에 비해 DM군은 2.3배 높았고 ZDM군은 DM에 비해 낮아졌으며, EDM군은 대조군과 비슷하였다. 간조직중의 환원형 glutathione(GSH) 함량은 대조군에 비해 DM군은 감소되었으나 ZDM과 EDM군은 DM군에 비해 각각 2.3, 1.7배씩 증가되었다. 산화형 GSH함량은 대조군에 비해 DM군이 증가되었고, DM군에 비해 ZDM군과 EDM군 모두 감소하였으며 GSH/GSSG비는 GSH비와 비슷한 경향이였다. 간조직중의 SOD, GSH-Px, GST활성은 모두 대조군에 비해 DM군은 유의적으로 감소되었으나 ZDM, EDM군은 DM군에 비해 증가되었다. 간장과 신장에서의 metallothionein 함량은 모두 대조군에 비해 DM, EDM군은 증가하였고, ZDM군은 20배, 5.3배 각각 현저히 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 대구효성가톨릭대학교 연구비에 의하여

연구되었습니다.

문 헌

1. Florence, T. M. : The role of free radicals in disease. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.*, **23**, 3(1995)
2. Forman, H. J. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase : A comparison of rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 396(1973)
3. Bompard, G. J., Prevot, D. S. and Bascands, J. L. : Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity : Application to cisplatin-induced toxicity. *Clin. Biochem.*, **23**, 501(1990)
4. Adams, J. J. D., Lauerburg, B. H. and Mitchell, J. R. : Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat : Regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **227**, 749(1983)
5. Patil, G. S. and Cornwell, D. G. : Intergradiation of α -tocopherol and the surface properties of its oxidation products. *J. Lipid Res.*, **19**, 416(1978)
6. Faure, P., Benhamou, P. Y., Perard, A., Halimi, S. and Roussel, A. M. : Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesion : effects of an oral zinc supplementation. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **49**, 282(1995)
7. Yang, J. and Cherian, M. G. : Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci.*, **55**, 43(1994)
8. Failla, M. L. and Kiser, R. A. : Hepatic and renal metabolism of copper and zinc in the diabetic rat. *Am. J. Nutr.*, **244**, E115(1983)
9. Cousin, R. J. : Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and intestine. *Nutr. Rev.*, **37**, 97(1979)
10. Brady, F. D. : Synthesis of rat hepatic zinc thionein in response to the stress of sham operation. *Life Sci.*, **28**, 1647(1981)
11. Brady, F. D. : Physiological function of metallothionein. *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 143(1982)
12. Failla, M. L. and Kiser, R. A. : Altered tissue content and cytosol distribution of trace metals in experimental diabetes. *J. Nutr.*, **111**, 1900(1981)
13. Thomas, J. P., Bachowski, G. J. and Girotti, A. W. : Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium and zinc-metallothioneins. *Biochem. Biophys. Acta*, **884**, 448(1986)
14. 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. Biophys. Acta*, **827**, 36(1985)
15. 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)
16. 백태홍, 전세원, 김친호 : 영양학실험. 수학사(1988)
17. Desbuquois, B. and Aurbach, G. B. : Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. En-*

- doocrinol. Metab.*, **33**, 732(1971)
18. Satoh, K. : Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chemica Acta*, **90**, 37(1978)
 19. 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)
 20. Marklund, S. and 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(1974)
 21. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. : Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952(1976)
 22. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase : the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130(1974)
 23. Bernt, E. and Bergmeyer, H. U. : Methods of enzymatic analysis : Glutathione. 2nd English ed., Academic Press, Vol. 4, p.1641(1974)
 24. 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)
 25. Kahn, C. R. : The molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. Med.*, **36**, 429(1985)
 26. 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)
 27. 이순재, 최원경, 하태열 : Streptozotocin 유발 당뇨병쥐에 있어서 항산화적 방어기구에 미치는 비타민 E의 영향. *일본영양식량학회지*, **48**, 451(1995)
 28. Panganamala, R. V. and Cornwell, D. G. : The effects of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, **393**, 376(1982)
 29. Thompson, K. H., Godin, D. V. and Lee, M. : Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of dietary manganese deficiency. *Biol. Trace Elem. Res.*, **35**, 213(1992)
 30. McDermott, B. M., Flatt, P. R. and Strain, J. J. : Effects of copper deficiency and experimental on tissue antioxidant enzyme levels in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **38**, 263(1994)
 31. Craft, N. E. and Failla, M. L. : Zinc, iron and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rat. *Am. J. Physiol.*, **244**, E122(1983)
 32. 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)
 33. Pattison, S. E. and Cousins, R. J. : Characterization of a labile intracellular zinc pool and its relationship to zinc uptake/exchange in rat hepatocytes. *Fed. Proc.*, **43**, 3712(1984)
 34. DiSilvestro, R. A. and Cousins, R. J. : Mediation of endotoxin-induced changes in zinc metabolism in rats. *Am. J. Physiol.*, **247**, E436(1984)

(1997년 2월 14일 접수)