

Alloxan으로 유발된 당뇨쥐의 간조직 Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase 효소의 변화

서울여자대학교 생물학과

박수영·조경혜†

국문초록: 닭의장풀 추출액을 쥐의 체중 1 kg 당 40 mg의 alloxan을 미정맥 주사한 당뇨쥐를 실험군으로 하여 혈당강하효과를 보았다. 정상대조군에게는 0.9% saline 용액을 투여하고 당뇨쥐에게는 쥐의 체중 1 kg당 100 mg의 식물단백추출액을 경구투여하여 683.6 ± 115.61 (mg/dl)에서 85.6 ± 43.34 (mg/dl)의 혈당치의 정상수준으로 회복하는 경향을 확인하였다. 정상군과 당뇨대조군, 약물투여군으로 나눈 실험쥐를 대상으로 간조직에서의 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 효소의 활성도를 측정한 결과 당뇨대조군에서는 정상군의 34.2%로 G6PD 효소 활성도가 감소되었으며 식물추출액을 투여함으로써 정상치의 61%로 회복되었다. 실험쥐 간조직내에 G6PD 효소활성도의 감소 또는 회복과 G6PD isozyme 분자의 구조변화와의 연관성을 알아보기 위하여 native gel 전기영동을 실시하였다. 정상쥐의 간조직에서의 G6PD isozyme 형태는 band I, II, III (전기영동상의 분자이동 차이에 따른 형태)로 나타났고 alloxan을 투여한 당뇨쥐의 간조직내에서는 band I, III만이 나타났다. 닭의장풀 추출액을 투여한 실험군에서는 G6PD의 isozyme 형태가 정상쥐의 경우에서와 같이 band I, II와 III가 모두 나타났다. 이러한 결과는 G6PD isozyme의 구조변화가 G6PD의 효소활성도와 매우 큰 연관성이 있는 것으로 보여진다.

서 론

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-G6PD: NADP oxidoreductase, EC I.1.1.49)는 glucose-6-phosphate에 특이적 효소이며 환원력을 가지는 NADPH를 생성하는 pentose phosphate pathway를 거치는 일차적 효소이다. 몇 개의 이형접합체로 구성된 효소로서 사람에게 있어 유전적 변이를 보이고 있으며 drug sensitive hemolytic anemia인 경우에는 erythrocyte G6PD 효소활성도의 감소와 관련되며 비정상적 형태가 전기영동상에서 확인되었다¹⁾.

정상쥐의 조직 추출상등액에서 여러개의 bands 형태가 나타나고 carbon tetrachloride의 처리에 의해서 bands 형태가 변화하는 것이 보고되었으며¹⁵⁾, rat에서 다양한 발현단계에서의 G6PD의 다중

분자 형태 (isozyme)의 변화를 DNA, RNA와 protein 수준과 관련됨을 보고하였으며, 임신과 수유 중에 증가를 보이고 estrogen 수준이 증가되는 것과 매우 밀접한 연관성이 있다고 보고하였다¹⁾.

실험쥐의 간조직내 G6PD 합성과 분해율이 탄수화물 식이와 인슐린 투여에 의해 유도되는지의 여부를 알리는 실험이 시행되었고 탄수화물 식이에서 열량소모가 클수록 G6PD의 합성이 증가되고 pancreas로부터의 insulin 분비에는 자극을 받지 않으나 많은 양의 insulin을 투여할 경우에는 G6PD의 합성을 유도한다는 사실을 보고하였다¹⁰⁾.

당뇨병과 G6PD와 관련을 지어 정상쥐에 비해 당뇨쥐가 간조직내 G6PD 효소의 활성도가 현저히 감소하며 당뇨쥐의 G6PD 효소 활성도의 회복, 또는 증가를 혈당감소치의 정상화, 또는 감소와 관련지어 연구보고한 바 있다⁸⁾. 그러나 이러한 활성의 증감이 G6PD isozyme band 형태의 변화와 관계되는지는 보고된 바 없으며 이러한 G6PD isozyme 형태가 당뇨와 어떠한 관련을 갖

* 논문접수 1997년 11월 5일, 수정재접수 1998년 1월 19일

† 별책요청 저자

는가를 분자수준에서 깊게 연구되어지는 않았다. 현재까지 당뇨의 회복기전을 G6PD효소와 연관시켜 실험한 결과들이 꾸준히 보고되고 있으며 본 연구진에서도 당뇨 이상기전의 연구에 유용하게 사용될수 있는 당뇨관련의 표지효소를 찾아내기 위한 연구를 한 바 있고⁹⁾ 혈당강하효과가 있음을 검증한바 있는 닭의장풀 (*Commelina communis* L). 식물추출물을 당뇨쥐에 투여함으로써 G6PD의 효소활성도가 정상쥐의 수준으로 회복, 또는 증가의 경향을 나타냄을 확인하였다.

본 실험에서는 오래 전부터 식용 또는 약용으로 이용되어왔던 닭의장풀을 대상으로 이 추출 성분이 alloxan으로 당뇨가 유발된 쥐에게서 항당뇨성 약리효과와 이 성분이 당뇨쥐의 대사과정에 어떠한 변화를 유발하는지를 당뇨와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 G6PD 효소를 대상으로하여 효소의 활성도와 isozyme pattern을 조사연구하였다.

재료 및 방법

1. 닭의장풀의 조제

1) 채집 및 보관

본 연구에 사용된 약용식물은 1997년도 5월과 7월 사이에 노원구 공릉동에 위치한 야산에서 채집하여 사용전 까지 -80℃ 냉동고에서 보관되었다.

2) 식물추출액의 조제

냉동된 약용식물은 예리한 칼로 미세하게 자른 후 유발에 담아 액체질소를 가하여 분말이 되도록 마쇄한후 분말을 모아 10 mM Tris-HCl 완충 용액, pH 7.4에 용해시킨 후 하룻밤 재워 세포내 성분을 용출시키고 4℃에서 18,000 ×g으로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 (NH₄)₂SO₄을 천천히 소량씩 가하여 그 농도가 80% 되게한 후 4℃의 냉장고에 하룻밤을 방치하였다가 원심분리하여 얻은다음 투석하여 염을 제거한 후 농축건조하여 동물실험에 사용하였다.

2. 동물실험

1) 쥐의 구입 및 사육

동물실험에 사용된 흰쥐는 Sprague-Dawley의 수컷으로서 고품사료를 주었고 사육실의 온도는 25℃를 유지하여 사육하였으며 몸무게가 250 g으로 균일하게 자라도록 한 후 실험에 사용하였다.

2) Alloxan에 의한 쥐의 당뇨유발

몸무게 250 g 정도로 키운 쥐의 몸무게를 각기 잰 후에 몸무게 1 kg 당 40 mg의 alloxan을 함유한 saline 용액을 미정맥 주사하여 당뇨를 유발시키고 48시간 후에 꼬리를 잘라 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 당 함량을 측정하여 당뇨 유발을 확인하였다.

3) 약용식물 추출액의 주입

혈당치를 측정된 후 당뇨가 유발된 쥐를 당뇨대조군과 식물추출액 처리군으로 나누고 정상군과 당뇨대조군은 saline을 경구투여하였고 약물 처리군은 농축건조된 약용식물 추출액을 몸무게 kg 당 100 mg을 saline에 녹여 1일 2회 3일간 경구투여하였다.

4) 장기해부 및 혈청채취

3일 동안 약용식물 추출액 및 saline이 경구투여된 실험쥐는 탈골시킨 후 경추부위를 절단하여 혈액을 채취한 후 일시에 해부하여 각종 장기를 채취하여 사용 전까지 -70℃의 냉동고에서 보관하였다. 채취된 혈액은 혈청을 분리하여 영동제약에서 구입한 포도당 측정용 시약 Glucose-E kit으로 혈당치를 측정하고 UV-spectrophotometer에서 비색 정량 (505 nm)하여 측정하였다.

혈청의 glucose 함량의 계산은 다음과 같다.

$$\text{Glucose (mg/100ml)} = 200 \times \frac{\text{sample의 흡광도}}{\text{glucose 표준액의 흡광도}}$$

5) 효소활성 측정

당뇨의 대사이상 기전의 연구에 유용하게 사용되고 있는 당뇨관련 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)를 측정하였다. 50 mM Tris · HCl (pH 7.5) buffer에 4 mM의 glucose-6-phosphate (G6P)와 75 μM의 NADP⁺와 10 mM의 MgCl₂를 가하고 37℃에서 30분간 미리 평형화시킨다음 효소용액을 가해 섞은 후 15초 간격으로 340 nm의 파장에서 흡광도를 3분 동안 측정하였다¹⁴⁾.

6) 단백질 함량 분석

단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준시약으로하여 Lowry⁶⁾ 등의 방법으로 측정하였다.

7) G6PD의 단백질형태 연구

각 실험군으로부터 얻은 각각의 조직 추출액에서 glucose-6-phosphate dehydrogenase 효소의 isozyme pattern 변화를 관찰하기 위하여 non-de-

nature gel electrophoresis을 실시하였다¹³⁾. 1.5 M Tris · HCl (pH 8.8) buffer를 사용하여 20-6% gradient separating gel을 만들고 0.5 M Tris · HCl (pH 6.8) buffer로 4% stacking gel을 만들어 전기영동하였고 이후 gel은 enzyme staining 방법²⁾으로 30분 동안 반응시켰다.

8) Western blotting

(1) Sample preparation: 각 실험군으로 부터 얻은 조직을 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mM PMSF와 1 mM EDTA를 포함하는 20 mM Tris · HCl (pH 7.5) buffer로 같은 후 voltex하여 ice bath상에서 30분간 유지시킨 다음 18,000 × g (4℃)에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 사용하기전까지 -70℃에서 보관하였다⁹⁾.

(2) Immunoblot analysis: 각 실험군으로부터 얻은 각각의 조직추출액을 SDS-gel상에서 전기영동을 실시한 후 transblot kit (Bio Rad)에서 48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.0375% SDS와 20% MeOH를 포함하는 one-buffer system을 사용하여 4℃에서 12시간 동안 50 V로 시행하여 NC paper로 transfer시켰다. Blot은 nonfat dry milk (5%)을 포함하는 PBS buffer에서 12시간 동안 4℃ 냉장고에서 방치시킨 후 tween20을 포함하는 PBS (PBS-T)로 5분씩 2회 세척하였다. Serotec (Cat. No. MCA1356)으로 부터 구입한 antibody(anti-insulin receptor α-subunit)를 1:1000으로 희석한 PBS-T에서 1시간 동안 유지시킨 후 동일한 buffer로 10분씩 3회 세척하였다. 이후 과정은 avidin-biotin-peroxidase 방법 (ABC, vector)을 이용하여 수행하였고 peroxidase 효소반응은 DAB⁴⁾ 방법에 따라 발색시켰다.

결 과

1. 닭의장풀 추출액 혈당강하 작용

닭의장풀 추출물의 단백질 함량을 측정하고

체중 1 kg 당 단백질량 100 mg을 경구투여하여 혈당강하효과를 실험하였다. 쥐의 체중 1 kg당 40 mg의 alloxan을 미정맥 주사한 결과 정상군의 혈당수준보다 5.5배 증가하였다. 이들을 2개의 실험군으로 나누어 당뇨대조군과 약물처리군으로 정하였고 정상대조군으로서는 0.9% saline 용액을 미정맥주사하였다 (Table 1). 실험결과 4일째의 정상군의 혈당치는 117.8±18.85에서 81.2±9.28로 다소 감소하였으나 정상범위내의 혈당치를 유지하였고 당뇨대조군에서도 다소 감소의 경향을 보였으나 424±94.83으로서 당뇨수준을 유지하였다. 약물처리군은 683.6±115.61에서 85.6±43.34로 감소하여 정상군의 혈당치 수준으로 회복하는 경향을 보였고 이들은 p<0.05의 유의수준을 가졌다.

2. 간조직내 G6PD의 효소활성도

각 실험군으로 부터 적출한 간조직내에서의 G6PD 효소활성도를 측정하였다 (Fig. 1). 정상쥐의 G6PD 효소활성도는 65.04±15.31이고 alloxan으로 유도된 당뇨쥐의 G6PD 효소활성도는 22.21±4.4로서 수치로 보여 정상군보다 34.2%로 감소되었고 닭의장풀 추출물을 투여한 실험쥐의 간조직에서는 40.06±5.73 수준의 효소활성도를 보여 당뇨쥐의 효소활성도보다 약 1.8배 증가한 것으로 나타났으며 정상군과 비교했을 때는 61.6%의 회복률을 보였다.

3. G6PD 효소의 Isozyme pattern의 변화

효소활성의 변성을 최소화하기 위해서 본 실험에서는 native gel 전기영동을 실시하였고 G6PD의 효소활성도 및 G6PD isozyme 형태를 gel상에서 효소반응을 시켜 염색된 부위를 관찰 비교하였다. 정상쥐의 간조직에서의 G6PD isozyme 형태는 3개의 band pattern (I, II & III: 전기영동상에서 이동이 빠른 순서)으로 나타났고, alloxan이 투여

Table 1. Hypoglycemic effect of plant extract fractionates on glucose level in alloxan-induced diabetic rats

Group	Dose (p.o.)	No. of animal	Blood glucose 0 day	level (mg/ml) 4 day
Normal ^{a)}	2 ml/kg ^{b)}	5	117.8±18.35	81.2±9.28
Alloxan control	2 ml/kg ^{b)}	5	617.0±67.66	424.0±94.83
80% ppt (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitates treated	100 mg/kg	5	683.6±115.61	85.6±43.34*

All values are mean±SD, ^{a)}: alloxan untreated group, ^{b)}: only saline treated, *: Statistical significance compared with alloxan control data: *p<0.05

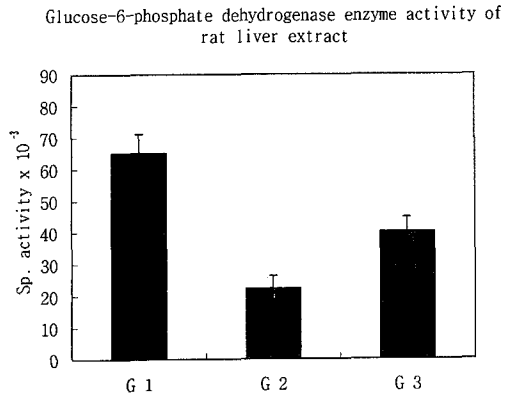


Fig. 1. Effects of plant extract on the enzymatic activities in alloxan induced rat liver extracts (G1: normal rat, G2: alloxan-induced diabetic rat, G3: *Commelina communis* L. extract treated diabetic rat).

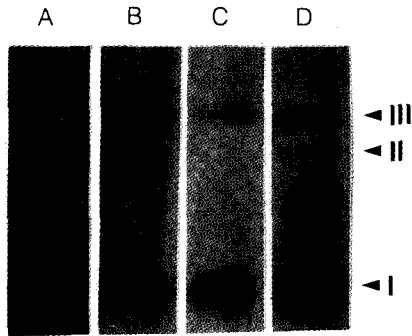


Fig. 3. Western blot analysis of insulin receptor α -subunit in anti-insulin receptor antibody in alloxan-induced diabetic rat liver extract. They were processed according to the avidin-biotin-peroxidase procedure (ABC,vector), the peroxidase reaction was developed using DAB method. Sample solutions were heated and 500 μ g of sample protein were loaded per lane (G1: normal rat, G2: alloxan-induced diabetic rat, G3: *Commelina communis* L. extract treated diabetic rat).

닭의장풀 추출물이 인슐린과 유사한 작용을 가지는지의 여부를 알기 위하여 간조직 세포막에 존재하는 insulin receptor (IR)의 양적 변화를 살펴 보았다.

먼저 각 실험군의 간조직액을 시료로하여 전기영동을 시행한 후 western blotting을 시행하였다 (Fig. 3). 실험 결과에 따르면 당뇨가 유발된 실험쥐, 그리고 정상쥐와 식물추출액을 투여한 실험쥐 간조직에서의 IR은 모두 120 KD의 위치에서 band로 나타났다. Alloxan으로 유도된 당뇨 쥐의 IR의 양적변화는 정상군과 비교했을 때 증가로 나타났고 이것은 당뇨로 인하여 유발된 고혈당이 직접 또는 간접적으로 영향을 미친 것으로 보여지며 식물추출액 투여군에서는 당뇨군과 같은 농도의 진하기가 유지된것으로 보아 식물추출액의 성분이 IR의 합성 또는 생성에 직접적으로 관여하지는 않는 것으로 보여진다. 각 실험군의 전체적 양상은 IR의 양적변화가 다소 서로 차이를 보이지만 앞서 실험한 혈당치의 증감, 그리고 G6PD 효소의 활성도의 증감이나 G6PD isozyme pattern의 변화와 같은 유형의 감소 후 회복, 또는 유실 후 복구와 같은 양상의 흐름은 보이지 않았다.

고 찰

당뇨가 유발된 쥐에서는 탄수화물대사, 특히 pentosephosphate pathway의 주요대사효소인 G6PD 효소의 활성이 감소되는 것으로 보고되었고^{7,12)} 이는 G6PD의 효소활성 감소에 따른 ribose-5-

된 대조군에서는 band I과 III 만이 나타났다. 닭의장풀 추출액을 투여한 당뇨쥐군에서는 G6PD의 효소활성도가 정상군의 수치로 회복되는 것을 보여주었던 결과와 같이 G6PD isozyme band의 형태도 정상쥐의 경우에서와 같이 band I, II 및 III가 모두 나타났다 (Fig. 2).

4. Western blotting

닭의장풀 추출물을 당뇨쥐에게 투여한 결과 혈당수준이 정상과 유사한 수치로 감소되어 당뇨의 회복성향을 나타내었다. 이에 따른 기전이

phosphate와 NADPH의 생성감소를 유발하게 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험의 결과에 따르면 간조직에 있어서 당뇨에 의한 가장 직접적 손상은 탄수화물대사로 추정되며, 혈당강하 효과를 가지는 닭의장풀 추출물에 의해 당뇨회복의 지표로서 혈당치가 정상수준으로 감소되었고, G6PD 효소의 활성도 또한 정상화로의 회복을 보여줌으로써 당뇨는 탄수화물대사 효소인 G6PD 효소활성대사와 매우 밀접한 관련이 있음을 짐작할 수 있었다. 자세한 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 Mammalian tissue에서의 효소활성과 분해의 조절을 연구하기 위한 model protein으로서 쥐 간조직의 G6PD가 사용되었음에 착안하여³⁾ 각 실험군의 간조직으로부터 G6PD isozyme pattern의 변화를 관찰하게 되었다. 최근의 연구보고에 따르면 실험쥐 간조직액을 polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 결과 G6PD isozyme이 다양한 시약의 첨가와 제거를 해줌으로써 G6PD의 isozyme bands 형태가 변화되는 것을 보여주었다^{2,11)}.

본 실험의 결과에 따르면 당뇨 실험군의 bands 형태에서 정상군에서는 있었던 band II가 유실되었고 약물처리로 당뇨가 회복된 실험군에서는 band II가 다시 나타났다. 따라서 이것은 당뇨로 인해 G6PD isozyme의 분자구조 변형이 일어나고 약물처리에 의해 변형된 isozyme 형태가 회복됨과 함께 혈당강하를 보임으로써 닭의장풀 추출액에 의한 혈당강하효과가 단순히 G6PD 효소활성 증가에 기인하기 보다는 특정한 isozyme의 활성을 변형시켜서 나타난다고 보겠다. 위의 사실을 근거로 하여 이 특정 isozyme의 조직특이성이나 분자구조 그리고 당뇨기전과의 관계를 밝히기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하리라고 본다.

참 고 문 헌

1. Arthur HR, and Russell H (1972): Influence of pregnancy, lactation and involution on glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase isoenzymes in the rat mammary gland. *Endo*, **291**(1): 87-295.
2. Cutillas C, Rodriguez B, German P, and Guevara D (1993): Isozymatic pattern of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Ascaris suum*. *Helminthol*, **67**: 226-232.
3. Donohue TM, Mahowald TA, Adams DJ, and Barker KL (1981): Glucose-6-phosphate dehydrogenase partial characterization of the rat liver and uterine enzymes. *Biochim et Biophysica Acta*, **658**: 356.
4. Folli F, Bonfanti L, Renard E, Kahn CR, and Merighi A (1994): Insulin receptor substrate-1(IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *Neurosci*, **14**(11): 6412-6422.
5. Kim OK, Park SY, and Cho KH (1991): Effect of *Commelina communis* extract on blood glucose level and changes enzymatic activity in alloxan-diabetic rats. *Kor J Pharmacogno*, **22**(4): 225-232.
6. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol Chem*, **193**: 265.
7. Makoff RK, Brown J, Mullen Y, and Clark WR (1983): Normalization of six key hepatic enzymes after fetal pancreas transplantation in diabetic rats. *Diabetes*, **32**: 730-733.
8. Pugazhenth A, Khandelwal RL, and Angel JF (1991): Insulin-like effect of vanadate on malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1083**(3): 310-312.
9. Rosenzweig SA, Zetterstrom C, and Benjamin A (1990): Identification of retinal insulin receptors using site-specific antibodies to a carboxyl-terminal peptide of the human insulin receptor α -subunit. *Biol Chem*, **265**(29): 18030-18034.
10. Rudack D, Elaine E, Chrisholm S and Darold H (1971): Rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biol Chem*, **216**(6): 11249-1254.
11. Schmnkler M (1970): The heterogeneity and molecular transformations of glucose-6-phosphate dehydrogenase of the rat. *Biochim Biophys Acta*, **214**: 309-317.
12. Siamak A (1989): Intravenous use of glutamine in peptide Form: Clinical applications of old and new observations. *Metabolism*, **38**(8) suppl. 1 89.
13. Seyer HK (1976): Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats. *Clin Sci Mol Med*, **51**:

- 551.
14. Sock J, and Rohringen R (1988): Activity staining of blotted enzymes by reaction coupling with transfer membrane-immobilizer auxiliary enzyme. *Analytical Biochem*, **171**: 310-319.
15. Taketa K, and Watamabe A (1971): Interconvertible microheterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat liver. *Biochim biophys Acta*, **235**: 19-26.

=Abstract=

**Changes of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase on
Alloxan-induced Diabetic Rat**

Soo-Young Park and Kyung-Hea Cho[†]

Department of Biology, Seoul Woman's University, Seoul, 139-774

The hypoglycemic and metabolic effects of *Commelina communis* L. extract were investigated in alloxan-induced diabetic rats. The increased blood glucose level in the diabetic rats was significantly lowered with the treatments of the plant protein extract. Administration of the plant extract elicited the significant increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity in liver of alloxan-induced rats. Three isozyme patterns (band I, II & III : in order decreasing mobility) of G6PD were found when normal rat liver extract were subjected to electrophoresis on native polyacrylamide gel. On the other hand, G6PD band patterns of alloxan-induced rat liver extract were found band II isozyme missing. By treatment of plant extract in alloxan-induced rats has been showed pattern the recovery of missing band patterns. This indicates that changes of the G6PD isozyme might be related to the cellular process of diabetes.

Key Words: Alloxan, G6PD, Dehydrogenase

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 3(2): 169-175, December, 1997]

[†] Corresponding author