

## 비타민 E 보강식이가 KK마우스에서 간조직의 항산화계 효소 활성도에 미치는 영향

안현숙 · 서소영 · 김해리<sup>†</sup>  
서울대학교 식품영양학과

### Effects of Vitamin E Supplementation on Antioxidative Enzyme Activities in Liver KK Mice

Hyun-Sook Ahn, So-Young Seo and Harriet Kim<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of vitamin E supplementation on the activities of antioxidative enzymes in liver of KK mice of various ages and various duration of diabetes. Diabetes was induced by feeding high fat diet containing 20% corn oil(wt/wt). Weaned KK mice were fed high fat diet containing 51 IU or 2080 IU vitamin E per kg diet. Animals were sacrificed at 4, 6, and 9 months of age. In nondiabetic group, we found the decrease of antioxidative enzyme activities with aging. In diabetic group, antioxidative enzyme activities were decreased, and the change of hepatic vitamin E was related to glutathione peroxidase activity( $r=0.71$ ,  $p<0.001$ ). Treatment with vitamin E did not modify the level of fasting blood glucose. However, it was observed that glutathione reductase and glutathione peroxidase activities as well as hepatic glutathione levels were increased by vitamin E supplementation, whereas catalase activity did not change. The present result suggests that high vitamin E supplementation protects against lipid peroxidative damage in diabetic KK mice.

**Key words:** high vitamin E supplementation, duration of diabetes, antioxidative enzymes, hepatic glutathione

#### 서 론

비타민 E는 생체막 내에서 유리라디칼 소거기능을 가짐으로써 유리라디칼의 공격으로부터 세포막 내의 다가 불포화지방산을 보호해주는 1차적인 지질과산화 방어제로 생각되고 있다. 항산화계에 의해 저지를 받지 않을 경우 고도로 불안정한 유리라디칼은 세포막의 구조와 기능을 모두 손상시킬 수도 있기 때문이다(1,2). 유리라디칼의 손상으로부터 신체를 보호해 주는 항산화제에는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 및 glutathione peroxidase(GPX), glutathione reductase (GR)와 같은 효소와 비타민 E, C 및 베타 카로틴 같은 비타민, glutathione, selenium 등이 있다(3,4).

잘 조절되지 못한 당뇨에서 산화적 스트레스가 증가된다고 보고되는데 SOD와 catalase 활성 변화, glutathione 대사와 비타민 E 수준의 변화, 지질과산화물의

증가가 관찰되었다(5-10). Alloxan이나 streptozotocin으로 유도한 당뇨시에 catalase 활성은 간, 신장, 적혈구에서 증가되고 지라에서 감소되었다고 보고되었다(5). GPX의 활성은 제2형 당뇨병환자의 적혈구에서 감소한다고 보고되었으며(6), 적혈구 SOD가 감소되어 있고 혈청 지질과산화가 증가되어 있으며 혈청과 적혈구의 GSSG-GSH비가 증가되어 있다고 보고되었다(7,8).

한편, 당뇨인의 경우 비타민 E 결핍시 보이는 적혈구 응고 증상이 관찰되었으며 적혈구에서 비타민 E 양이 정상인보다 낮고, MDA, lipofuscin 함량이 높은 것으로 나타났다(9). 또, 당뇨 20주의 쥐에서 혈청의 비타민 E는 감소되었고, 간의 비타민 E도 감소되었다고 보고되었다(10). Asayama 등(11)은 비타민 E 결핍시 간, 심장 골격근에서 SOD의 수준은 모든 조직이 정상의 20% 수준이었다고 보고했다. 또 체장의 Mn-SOD활성은 비타민 E 부족시 유의적으로 낮은 반면, CuZn-SOD활성

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

은 더 높게 나타났으며, catalase 활성은 비타민 E 결핍군에서 유의적인 변화가 없었다고 하였다.

지금까지 당뇨 동물에서 항산화 효소들의 활성도 변화는 종과 조직에 따라 다양한 결과를 나타냄이 보고되고 있고, 또한 당뇨 유병기간에 따른 변화에 대한 연구들은 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 당뇨상태에서의 항산화계 효소 활성변화를 확인하고, 비타민 E 보강식이기에 미치는 영향을 밝혀보고자 계획되었다. 이를 위해 제 2형 당뇨병의 동물 모델인 KK 마우스를 사용하였는데, KK 마우스는 일본에서 처음 개발된 Japanese KK 마우스와 이를 C57BL/6종과 교잡시킨 Toronto-KK(T-KK) 잡종 마우스, 이외의 몇 가지 종으로 나누어진다. T-KK 마우스의 경우 체중 증가가 나타나면서 고혈당이 나타나나, Japanese KK 마우스의 경우 당뇨병을 발현시키기 위하여서는 고칼로리식이의 투여가 필요하다. KK 마우스의 고혈당 증세는 그다지 극심하지는 않으며, 생후 약 4개월에서 1년 사이에만 나타나는 것으로 보고되어 있다(12).

본 실험은 KK 마우스에 고지방식을 섭취시켜 당뇨를 유발하고, 당뇨유발 후 0개월, 2개월, 5개월에 간의 항산화계 효소의 활성도 및 glutathione의 변화를 확인하고, 당뇨병에 의한 변화가 비타민 E의 투여로 억제되는지 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험식이 및 당뇨 유도

생후 4주째인 KK 마우스를 서울대학교 실험 동물 사육장으로부터 공급받아 1개월간 일반 고형사료(삼양사)를 먹이면서 사육하였다. 그 후 고지방, 저비타민 E식이군(이하 고지방식이군)과 고지방, 고비타민 E식이군(이하 고비타민 E식이군)으로 나누어 8주간 사육하고 혈당을 측정하여 비당뇨군과 당뇨군으로 나누고 계속 사육하면서 4개월, 6개월, 9개월에 희생시켰다.

고지방식이(fat 20 weight %, 39 cal %)의 조성은 Table 1과 같다. 이 고지방식이의 비타민 E 수준은 51 IU/kg diet이다. 이는 옥수수 기름에 들어 있는  $\alpha$ -tocopheryl acetate 양으로부터 기인된 것이며, 비타민 E를 포함하지 않는 비타민 혼합물은 ICN(ICN Biochemicals, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 또 고비타민 E식이에 dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate(Sigma Chemical, USA)를 첨가하여 비타민 E의 수준은 2,080 IU/kg diet로 하였다. 실험기간 동안 사육 환경은 온도 20~25°C를 유지하였으며 습도는 60%로, 명암주기는 12시간 간격으로 유지하였다.

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredient	(g/kg diet)
Corn starch	544
Casein	150
Corn oil	200
$\alpha$ -Cellulose	50
Mineral mixture <sup>1)</sup>	40
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	10
DL-Methionine	5
Choline chloride	1

<sup>1)</sup>Composition of mineral mixture(/kg mixture)

CaHPO<sub>4</sub> 500g, NaCl 74g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 52g, potassium citrate monohydrate 220g, manganous carbonate 3.5g, ferric citrate 6.0g, zinc carbonate 1.6g, cupric carbonate 0.3g, KIO<sub>3</sub> 0.01g, KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.55g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01g, sucrose, finely powdered 118.9g

<sup>2)</sup>Vitamin E free mixture, ICN Biochemicals(Cleveland, Ohio)(/kg mixture)

Vitamin A acetate(500,000 IU/g) 1.8 g, vitamin D<sub>2</sub>(850,000 IU/g) 0.125g, ascorbic acid 45g, inositol 5g, choline chloride 75g, menadione 2.25g, p-aminobenzoic acid 5.00g, niacin 4.25g, riboflavine 1.00g, pyridoxine hydrochloride 1.0g, thiamine 1.00g, calcium pantothenate 3.00g, biotin 0.02g, folic acid 0.09g, vitamin B<sub>12</sub> 0.00135g, sucrose, finely powdered to 1kg

### 당뇨 판정

고지방식으로 사육한지 1개월 후부터 혈당을 측정하기 시작하였다. 월 2회 아침 9:00~10:00 사이에 꼬리 정맥에서 혈당을 측정하여 200mg/dl 이상이던 당뇨병으로 판정하였다(13). 혈당은 혈당 감지기(Blood glucose sensor, Medisense, Inc., Waltham, MA, U.S.A.)로 측정하였는데, 4개월에 비당뇨군과 당뇨군으로 나누어서 각각 9개월까지 사육하였다. 4개월에는 정상이었다가 실험기간 도중 당뇨가 발생된 것은 비당뇨군에서 제외시켰고, 4개월에 당뇨가 발생된 것만 당뇨군으로 분류 후 실험에 이용하였으므로 당뇨군 6개월은 당뇨 발생 후 2개월, 당뇨군 9개월은 당뇨 발생 후 5개월이 된다.

### 분석 시료의 전처리

실험동물은 희생시키기 전 18시간 동안 금식을 시켰다. 실험동물은 생후 4개월, 6개월, 9개월에 decapitation 방법으로 희생하였고 희생시키기 전 혈당과 체중을 측정하였다. 간 조직을 추출하여 차가운 생리식염수에 세척한 후, 흡수지로 물기를 제거하고 액체질소로 급속냉동시킨 후 냉동 보관했다가 분석에 사용하였다.

Glutathione peroxidase(GPX), glutathione reductase(GR), catalase(CAT)의 활성도 측정

간을 잘게 다진 후 homogenizing media(154mM KCl,

50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4)를 넣고 4°C에서 균질화한 다음, 4°C, 1,000×g에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 모아 4°C, 10,000×g에서 20분간 원심분리하여, pellet은 10mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 재부유시켜 액체질소로 급속냉동 후 냉동보관하였다. 상층액은 모아서 4°C, 100,000×g에서 60분간 다시 원심분리하여 cytosol층(상층액)과 microsome층(pellet)으로 분리하였고 cytosol층을 액체질소로 급속냉동한 다음 냉동보관하였다.

GPX의 활성도는 Tappel(14)의 방법을 이용하여 측정하였다. 기질로 cumene-hydroperoxide 첨가시 glutathione peroxidase 작용에 의해 생성된 산화형 glutathione이 과량의 glutathione reductase와 일정량의 NADPH의 존재하에 다시 환원되는 속도를 측정하였다.

GR 활성도는 Carlberg와 Mannervick(15)의 방법으로, catalase활성은 Aebi(16)의 방법으로 측정하였다. 시료의 단백질 정량은 Smith 등(17)의 방법에 준하여 하고, 표준품으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

#### 간 조직내 비타민 E 함량

간 조직내 비타민 E 함량은 Furr 등(18)의 방법으로 정량하였다. 수분을 제거할 목적으로 간 조직무게 3배의 anhydrous sodium sulfate를 가하여 마쇄한 다음 HPLC용 dichloromethane을 가하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이어서 하층부위에 dichloromethane을 가하여 동일한 방법으로 추출을 수회 반복하였다. 최종 상층액을 pore size 0.45μm의 membrane filter(Hamilton, USA)로 여과시킨 다음, 질소 가스하에서 농축시켰다. 최종 시료를 diethylether-methanol로 용해시킨 후 HPLC에 주입시켰다. Column은 μ-Bondapak C<sub>18</sub>을 사용하였고 detector는 UV 280 nm, intergrator는 Waters 746을 사용했다. 용출액은 methanol : H<sub>2</sub>O(95 : 5)을 사용하였으며 용출액의 흐름 속도는 1.5ml/min, sample injection량은 30μl로 하였다.

#### Glutathione의 정량

Glutathione의 정량은 Griffith(19)의 방법을 변형하여 측정하였다. 조직균질액 0.1ml에 1% picric acid 0.1 ml을 넣은 후 3000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 1ml의 반응계(0.2mM NADPH, 0.6mM DTNB, 5mM EDTA, 200U glutathione reductase, 5μl sample, 100mM potassium phosphate, pH 7.5)에 넣어 412nm에서 흡광도의 변화를 기록하였다. 반응은 30°C에서 시

행하였다. 상층액 시료 1ml을 따로 취하여 20μl의 2-vinyl pyridine을 첨가하여 세게 혼든 다음 상온에서 1시간 동안 세워둔 후 상기방법으로 glutathione을 측정하였다. 이때 2-vinyl pyridine이 없는 시료에서는 전체 glutathione을, 2-vinyl pyridine이 있는 시료에서는 GSSG(oxidized glutathione)를 측정하였고, 전체 glutathione에서 GSSG를 제외한 나머지 glutathione을 GSH로 산출하였다.

#### 통계처리

각 분석치는 평균±표준편차로 제시하였다. 각 실험군간의 유의도 검증은 Tukey's HSD test에 의하여 p<0.05 수준에서 실시하였고, 각 지표간의 유의성을 알아 보기 위해서는 대조군과 T-test를 실시하였고, 간의 비타민 E 농도 및 항산화효소 활성도 들의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient로 알아보았다.

#### 결과 및 고찰

체중의 변화는 Fig. 1과 같다. 고지방식이 섭취시, 체중의 증가는 당뇨군이 비당뇨군보다 컸으며 통계적인 유의차를 보였다(p<0.05). 당뇨군은 2개월에서 4개월까지의 체중 증가량이 가장 컸으며 그 후로는 증가량이 점점 감소하였다. 비당뇨군은 당뇨군 보다 체중이 작았고, 개월별 증가량도 비슷하였다. 당뇨군에서는 당뇨가 유도되는 시기인 2개월부터 4개월 사이에 6g이 증가되었으나 동일한 시기에 비당뇨군에서는 2.5g이 증가되

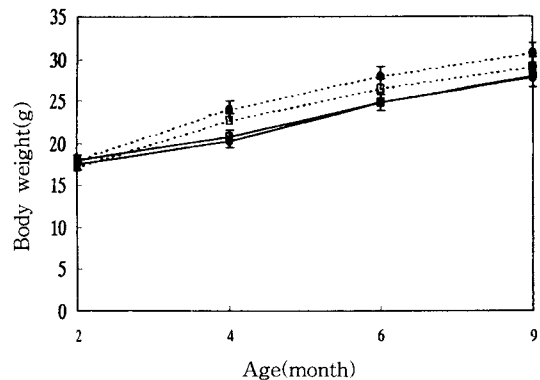


Fig. 1. Effects of vitamin E supplementation on body weight of KK mice.

8 KK mice for each point. Values are mean±SD. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet).

High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet).

●—: Low VE nondiabetic, ●- -: Low VE diabetic  
- -□- -: High VE diabetic, - -□—: High VE nondiabetic

었다. 고비타민 E식이에 의해서 체중 증가에서 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 고지방식이 섭취시 당뇨병군에서 신장의 무게가 증가되었음을 관찰하였다(3.97±0.61 vs 3.31±0.38, p<0.05). 고비타민 E식을 섭취한 경우 4개월에 신장 무게에 있어서 당뇨병군이 비당뇨군과 유의적인 차이를 나타내지는 않았는데, 고지방식을 섭취한 당뇨병군의 신장 무게가 비당뇨군보다 유의적으로 컸었던 것과 대조를 보였다.

혈당의 변화는 Fig. 2와 같다. 고지방식이 섭취시, 공복시 평균 혈당은 비당뇨군에서는 월령이 증가하여도 변함이 없었고, 당뇨병군에서는 4개월, 6개월, 9개월에서 평균 공복시 혈당은 각각 180, 156, 127(mg/100ml)을 나타내어 당뇨 KK마우스는 당뇨가 진행될수록 혈당이 낮아지는 경향을 나타내었다. 본 연구 결과는 KK-마우스의 고혈당 증세는 그다지 극심하지 않으며 생후 4개월에 나타나 9~12개월까지 유지된다고 하는 보고(20)와 일치된다. Camerini-Davalos 등(21)에 의하면 가장 높은 혈당치는 2~6개월된 KK 마우스에서 발견되었고, 더 나이든 마우스에서는 당내인성이 향상되었다고 하였다.

항산화 효소 활성도의 변화

간에서 항산화효소의 활성도를 측정한 결과는 Fig. 3~5와 같다. 고지방식이 섭취시 비당뇨군에서 월령이 증가함에 따라 GR의 활성도가 감소하여 9개월에서는 4개월의 68%를 나타내었다. 당뇨에 의해서 GR의 활성도는 감소되었고, 당뇨가 진행되면서 약간 증가되었다.

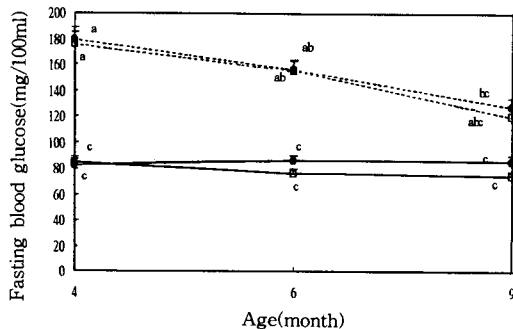


Fig. 2. Effects of vitamin E supplementation on fasting blood glucose in nondiabetic and diabetic KK mice. 8 KK mice for each point. Values are mean±SD. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet). Means with the same alphabets are not significantly different at p<0.05 by Tukey's test. --●--: Low VE diabetic, --□--: High VE diabetic, --○--: High VE nondiabetic, --●--: Low VE nondiabetic

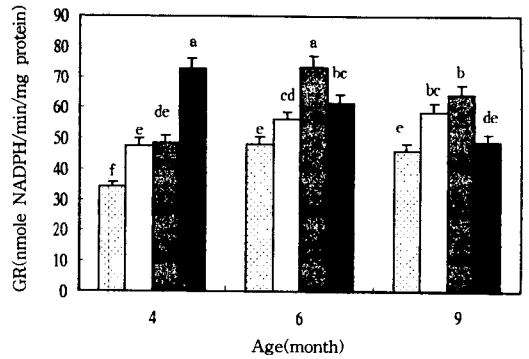


Fig. 3. Effects of vitamin E supplementation on hepatic GR activities in nondiabetic and diabetic KK mice. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet). Means with the same alphabets are not significantly different at p<0.05 by Tukey's test. Values are mean±SD, n=5~9 □: Low VE diabetic, □: High VE diabetic, ▨: High VE nondiabetic, ■: Low VE nondiabetic

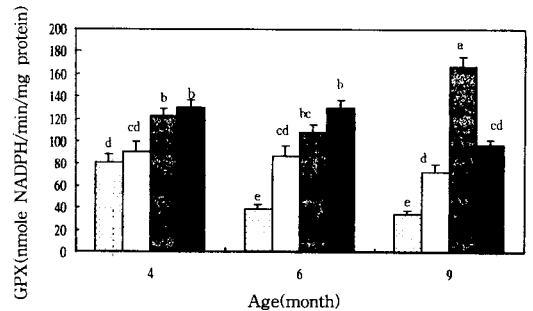
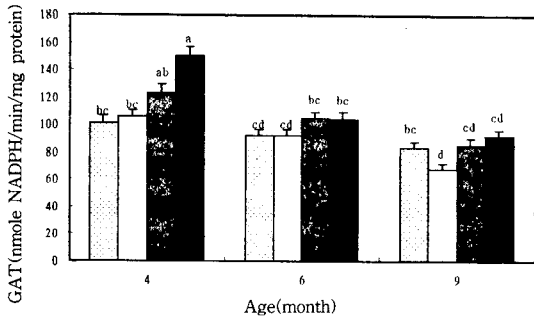


Fig. 4. Effects of vitamin E supplementation on hepatic GPX activities in nondiabetic and diabetic KK mice. Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet). Means with the same alphabets are not significantly different at p<0.05 by Tukey's test. Values are mean±SD, n=5~9 □: Low VE diabetic, □: High VE diabetic, ▨: High VE nondiabetic, ■: Low VE nondiabetic

GPX의 활성도는 비당뇨군에서 9개월에 급격히 감소되어 4개월의 75%값을 나타내었다. 당뇨에 의해서 GPX의 활성도는 감소되었고, 6개월에 급격히 감소되었으며 계속 그 수준이 유지되었다. CAT 활성도는 비당뇨군에서 6개월에 감소되었고, 월령이 증가되어도 더 이상 감소되지 않았다. 당뇨에 의해 CAT의 활성도는 감소되었으나 당뇨가 진행되어도 계속 그 수준을 유지하였다. 또 간의 항산화 효소 중 GPX가 비타민 E와 약간의 상관관계(r=0.71, p<0.001)를 나타냈다. 당뇨병군에서 항



**Fig. 5. Effects of vitamin E supplementation on hepatic CAT activities in nondiabetic and diabetic KK mice.**

Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet).

High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet).

Means with the same alphabets are not significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 5 \sim 9$

□: Low VE diabetic, □: High VE diabetic, ▨: High VE nondiabetic, ■: Low VE nondiabetic

산화계 효소들의 활성은 감소되었는데, 이러한 현상은 당뇨군에서 불포화지방산 함량이 높은 생체막이 산화적 stress에 대해 민감하여 지질과산화가 일어나게 되고, 이로 인해 효소활성에 필요한 세포 소기관들의 과산화적 손상이 가속화됨으로써 효소활성이 저하된 것으로 보인다.

고비타민 E식을 섭취시킨 경우 비당뇨군은 월령이 증가될 때 고지방식을 섭취한 비당뇨군에 비해 GR 활성도가 증가되었고, 당뇨 발생시에도 고지방식을 섭취한 당뇨군에 비해 GR 활성도가 증가되었다.

GPX의 활성도는 비당뇨군에서는 고지방식을 섭취한 비당뇨군에 비해 증가되었고, 당뇨발생시에도 고지방식을 섭취한 당뇨군에 비해 증가되었다. CAT의 활성도는 고비타민 E식이에 의해 별로 영향을 받지 않았다.

당뇨발생에 의해서 항산화계 효소 활성이 감소되나 비타민 E를 다량 공급했을 때에는 항산화계 효소 활성이 증가되었다. 이는 비타민 E가 생체막에 다량존재하는 다불포화지방산에 대해 chain-breaking antioxidant로서 작용하여 세포막의 소기관들을 과산화로부터 보호함으로써 효소활성의 최적 구조를 유지시켜 주는데 기여하기 때문으로 생각된다(22).

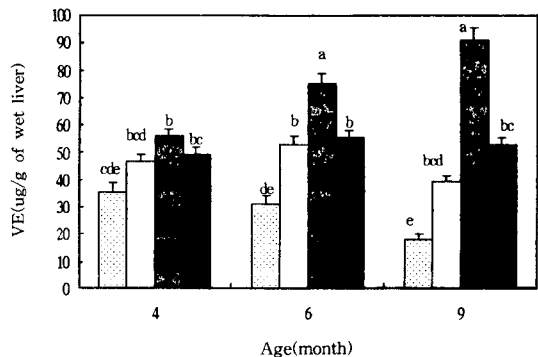
합병증의 발생 빈도가 당뇨병 이환 년수에 비례하여 상승한다는 여러 보고들이 있으나, 당뇨 이환기간에 따른 변화에 대한 연구들은 많지 않다. 유 등(23)이 당뇨병 환자의 적혈구에서 항산화 활성도의 변화를 측정 한 실험의 결과에서는 당뇨병의 이환기간에 따른 적혈구

SOD의 활성도는 당뇨병의 이환기간이 10년 이상인 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였고, GPX의 활성도는 대조군, 5년 이하군 및 5년~10년군에 비해 당뇨병의 이환기간이 10년 이상인 군에서 유의적인 감소를 보였다. 그러나 catalase의 활성도와 총 glutathione량은 유의한 변화를 보이지 않았다고 한다. 또, 총 glutathione량과 GPX의 활성도가 당뇨병성 신증이 없는 군에 비하여 당뇨병성 신증이 있는 군에서 유의한 감소를 보였다고 하였다.

설치류에 대한 비타민 E의 생리적 필요량은 15IU/kg diet로 권장량은 40IU/kg diet이다(24,25). 비타민 E를 과량 투여했을 때 장에서의 흡수율이 저하되고 대변으로 많은 양이 배설되므로, 항산화제로 식이에 첨가해 준 비타민 E는 과량 투여시에도 독성은 낮다. 마우스에서 2740mg/kg diet 보충시에도 독성이 관찰되지 않았다(26,27). 비타민 E로 인한 독성은 출혈과 면역기능 저하로 나타나는데(28) 백서에서 10,000IU/kg diet를 16개월간 섭취시켜도 독성이 나타나지 않았다는 보고가 있고(24), 본 실험에서도 7개월간 고비타민 E(2,080IU/kg diet)를 섭취시켰을 때 비타민 E로 인한 독성이 관찰되지 않았다.

간의 비타민 E 및 glutathione 함량 변화

Fig. 6에서 나타난 바와 같이 고지방식이 섭취시, 비당뇨군에서는 월령이 증가하여도 비타민 E의 함량 변화는 없었다. 당뇨 발생에 의해 비타민 E 함량은 감소



**Fig. 6. Effects of vitamin E supplementation on hepatic vitamin E in nondiabetic and diabetic KK mice.**

Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet).

High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet).

Means with the same alphabets are not significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 5 \sim 9$

□: Low VE diabetic, □: High VE diabetic, ▨: High VE nondiabetic, ■: Low VE nondiabetic

**Table 2. Effects of vitamin E supplementation on hepatic glutathione contents of 9 month old KK mice**

Groups	(μmole/g wet tissue)		
	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Low VE nondiabetic	4.50±0.84 <sup>a</sup>	0.20±0.04 <sup>b</sup>	22.5 ±1.63 <sup>a</sup>
High VE nondiabetic	4.53±0.51 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>b</sup>	26.64±2.77 <sup>a</sup>
Low VE diabetic	2.70±0.57 <sup>c</sup>	0.39±0.15 <sup>a</sup>	7.34±1.91 <sup>c</sup>
High VE diabetic	3.82±0.61 <sup>b</sup>	0.26±0.05 <sup>ab</sup>	14.69±2.22 <sup>b</sup>

Mice with the diabetic period for 5 months were used  
Low VE: High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51 IU VE/kg diet)

High VE: High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet).

All vlaues are mean±SD(n=6~7)

Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

되었고, 9개월에는 비당뇨군의 34% 수준까지 되었다. 당뇨군에서 간의 비타민 E 농도가 유의적으로 감소된 것은 간 이외의 조직으로 비타민 E의 흡수가 증가되어서라고 생각된다. 여기서의 간 이외의 조직으로는 혈장 지단백, 혈소판, 적혈구 등을 들 수 있는데, 특히 당뇨시 혈소판에서의 비타민 E 증가가 두드러진다고 보고되었다(29,30). Higuchi(10)가 Wistar rat에 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 후 당뇨 후 1주, 2주, 20주 후에 희생시켜서 실험을 하였을 때, 간의 α-tocopherol량은 당뇨군에서 감소되었고, 당뇨 20주에는 비당뇨군의 8.1% 수준이 되었다고 하였다.

Trostler 등(25)에 의하면 흰쥐의 간에서는 비타민 E 섭취량에 따라 비례적으로 비타민 E 저장량이 증가하나 지방조직에서는 비례적인 증가를 보이지 않았다고 하며 박 등(31)도 간에 비타민 E가 효과적으로 축적됨을 보고하였기에 본 실험에서는 간에서 비타민 E 함량을 측정하였다.

고비타민 E식이 섭취시 비당뇨군에서는 고지방식을 섭취한 비당뇨군에 비하여 비타민 E 함량이 증가되었는데 그 효과는 6개월군에서부터 나타나기 시작하였다. 고비타민 E식을 섭취한 경우 당뇨가 발생되어도 비타민 E 함량은 급격히 감소되지 않았다. 당뇨병 유발로 유리라디칼이 증가되고 이로 인해 조직의 과산화적 손상이 진행됨에 따라 조직 속에 존재하고 있는 비타민 E가 생체내의 이러한 과산화적 병리적인 대사에 항산화제로서 사용되어 조직내 비타민 E가 감소된 것이라고 추정된다(5). 고비타민 E식을 2개월간 먹인

4개월군보다 7개월간 먹인 9개월군에서 간의 비타민 E 양이 약 1.6배 높았다. 9개월군에서 고비타민 E 식이의 식이내 비타민 E 함량은 고지방식이의 비타민 E 함량의 37배였으나 간의 비타민 E 함량은 1.7배였다. 이는 비타민 E의 투여량이 증가되었으나 흡수율이 감소되었기 때문으로 사료된다(32).

Table 2에서는 간의 GSH 함량을 측정된 결과를 제시하였다. 고지방식이 섭취시 당뇨군에서는 비당뇨군에 비해 간조직 중의 GSH 함량은 감소되고 GSSG 함량은 증가되면서 GSH/GSSG 비가 감소되었으나 고비타민 E식을 섭취한 경우에는 당뇨군에서 GSH 함량 및 GSH/GSSG가 증가되는 결과를 나타냈는데 이로써, 비타민 E가 GSH 소모를 감소시킴을 알 수 있었다.

Krahl(33)은 당뇨쥐의 간에서 총 glutathione량이 감소함을 보고하였고, Gandi와 Chowdhury(34)는 사람의 적혈구 총 glutathione량이 치료받지 않은 당뇨군에서 정상보다 더 감소된 것으로 보고하였다. 또한, 유 등(23)의 실험에서는 적혈구 총 glutathione량이 감소된 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

이상의 결과 KK 마우스에서 월령 증가 및 당뇨에 의해 간의 항산화계 효소활성도, 비타민 E 농도 및 glutathione의 감소를 관찰하였고, 고비타민 E식은 이 변화를 억제하여 주었음을 확인하였다.

## 요 약

제 2형 당뇨 모델인 KK마우스를 이용하여 노화 및 당뇨유발에 의한 항산화계의 변화를 확인하고, 고비타민 E 보강식이(2080IU/kg diet)가 이에 미치는 영향을 밝혀 보고자 하였다. 제 2형 당뇨 모델로는 고지방식이(corn oil 20%, wt/ wt)로 당뇨가 유도된 KK 마우스를 사용하였다. 생후 4개월, 6개월, 9개월(당뇨 0개월, 2개월, 5개월)에 희생시켜 간의 항산화계 효소(GR, GPX, CAT)의 활성도 및 간의 비타민 E 농도를 측정하였다. 고지방식을 섭취한 경우, 비당뇨군에서는 월령이 증가됨에 따라 GR의 활성도가 감소하였는데, 당뇨 유도시에도 활성도가 감소되었다. 당뇨 0개월인 4개월에 GR 활성도의 감소가 큰 폭으로 관찰되었다. GPX 활성도는 9개월에 급격히 감소되었으며 당뇨발생에 의해서도 활성도가 감소되었다. CAT 활성도는 월령이 증가하면서 계속 감소하였고, 당뇨 유도시에도 활성도가 감소되어 당뇨가 진행되면서 계속 감소되었다. 고비타민 E식을 섭취시킨 경우 비당뇨군은 월령이 증가될 때 고지방식을 섭취한 비당뇨군에 비해 GR 활성도가 증가되었고, 당뇨 발생시에도 고지방식을 섭취한 당뇨군

에 비해 GR 활성도가 증가되었다. GPX의 활성도는 비당뇨군에서는 고지방식을 섭취한 비당뇨군에 비해 증가되었고, 당뇨 발생시에도 고지방식을 섭취한 당뇨군에 비해 증가되었다. CAT의 활성도는 고비타민 E 식이에 의해 별로 영향을 받지 않았다. 고지방식을 섭취시킨 경우, 비당뇨군에서 월령이 증가되면서 비타민 E 함량의 변화는 관찰되지 않았다. 당뇨 발생에 의해 비타민 E는 감소되었고, 당뇨가 진행되면서 계속 감소되어 9개월(당뇨 5개월)에서는 비당뇨군의 34% 수준까지 되었다. 고비타민 E식이 섭취시 비당뇨군에서는 고지방식이군에 비하여 비타민 E 함량이 증가되었는데 그 효과는 6개월 군에서부터 나타나기 시작하였다. 고비타민 E식을 섭취한 경우 당뇨가 발생되어도 비타민 E 함량은 급격히 감소되지 않았다. 고지방식이 섭취시 당뇨군에서는 비당뇨군에 비해 간조직 중의 GSH 함량은 감소되고 GSSG 함량은 증가되면서 GSH/GSSG 비가 감소되었으나 고비타민 E식을 섭취한 경우에는 당뇨군에서 GSH 함량 및 GSH/GSSG가 증가되는 결과를 나타냈는데 이로써, 비타민 E가 GSH 소모를 감소시킬 수 있었다. 이상의 결과 KK 마우스에서 월령 증가 및 당뇨에 의해 간의 항산화계 효소활성도, 비타민 E 농도 및 glutathione의 감소를 관찰하였고, 고비타민 E식은 이 변화를 억제하여 주었음을 확인하였다.

### 감사의 글

본 논문은 1998학년도 서울대학교 생활과학대학 부속 생활과학연구소의 일부 연구비 지원으로 수행되었습니다.

### 문헌

- Horwitt, M. K. : Interpretation of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B<sub>6</sub>. *Am. J. Clin. Nutr.*, **44**, 973(1986)
- Van Gossum, A., Kurian, R., Whitwell, J. and Jeejeebhoy, K. N. : Decrease in lipid peroxidation measured by breath output in normals after oral supplementation with vitamin E. *Clin. Nutr.*, **7**, 53(1988)
- Wefers, H. and Sies, H. : The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation in dependent on vitamin E. *Eur. J. Biochem.*, **174**, 353(1988)
- Halevy, O. and Sklan, D. : Inhibition of arachidonic acid oxidation by beta-carotene retinol and alpha-tocopherol. *Biochem. Biophys. Acta*, **918**, 304(1987)
- Matkovic, B., Barage, S. I., Szabo, L. and Witas, H. : The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolizing enzymes. *Horm. Met. Res.*, **14**, 77(1982)
- Uzel, N., Sivas, A., Uysal, M. and Oz, H. : Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res.*, **19**, 89(1987)
- Collier, A., Rumley, A., Paterson, J. R., Leach, J. P., Lowe, G. D. and Small, M. L. : Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients. *Diabetes*, **41**, 909(1992)
- Costagliola, C. : Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients *in vivo* and *in vitro* study. *Clin. Physiol. Biochem.*, **8**, 204(1990)
- Jain, S. K., Levine, S. N., Duett, J. and Holler, B. : Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes*, **40**, 1241(1991)
- Higuchi, Y. : Lipid peroxides and  $\alpha$ -tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Med. Okayama*, **36**, 165(1982)
- Asayama, K., Kooy, N. W. and Burr, I. M. : Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: Decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J. Lab. Clin. Med.*, **207**, 459(1986)
- Dulin, W. E. and Wyse, B. M. : Diabetes in the KK-mouse. *Diabetologia*, **6**, 317(1970)
- 이귀녕, 이종순 : 임상 병리 파일. 의학 문화사, 서울, p.90(1990)
- Tappel, A. L. : Glutathione peroxidase and hyperoxides. *Methods. Enzy.*, **52**, 506(1978)
- Carlberg, I. and Mannervick, B. : Glutathione reductase. *Methods Enzy.*, **113**, 484(1985)
- Aebi, H. : Catalase *in vitro*. *Methods Enzy.*, **105**, 121(1988)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Drovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 761(1985)
- Furr, H. C., Amedee-Manesme, O. and Olson, J. A. : Gradient reversed-phased high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring retinoids. *J. Chromatogr.*, **309**, 299(1984)
- Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, **106**, 207(1980)
- Taketomi, S., Ikeda, H. and Iwatsuka, H. : Determination of overall insulin sensitivity in diabetic mice KK. *Horm. Metabol. Res.*, **14**, 14(1982)
- Camerini-Davalos, R. A., Oppermann, W., Mittl, R. and Ehrenerigh, T. : Studies of vascular and other lesions in KK mice. *Diabetologia*, **6**, 324(1970)
- Urano, S., Midori, H. H., Tochihhi, N., Matsuo, M., Shiraki, M. and Ito, H. : Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids*, **26**, 58(1991)
- 유병진, 배학연, 이병래 : 당뇨병환자의 적혈구에서 항산화 효소 활성도의 변화. 대한내과학회잡지, **44**, 766(1993)

24. Yang, N. Y. and Desai, I. D. : Effect of high level of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats. *J. Nutr.*, **107**, 1418(1977)
25. Trostler, N., Brady, P. S. and Romsos, D. R. : Influence of dietary vitamin E on malondialdehyde level in liver and adipose tissue and on glutathione peroxidase and reductase activities in liver and erythrocytes of lean and obese(ob/ob) mice. *J. Nutr.*, **109**, 345(1979)
26. 최은주 : 비타민 E 보강식을 섭취한 KK마우스에서 지질과산화물과 혈청 당화단백질에 관한 연구. 서울대학교 석사학위 논문(1994)
27. Tappel, A., Fletcher, B. and Deamer, D. : Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J. Gerontol.*, **28**, 415(1973)
28. Philip, M. and Roberts, J. R. : Vitamin E. In "*Modern nutrition in health and disease*", Shils, E. M., Olsen, A. T. and Shike, M.(eds.), p.338(1994)
29. Tsutsui, M., Onuma, T., Ochiai, S., Boku, A., Yanada, A. and Takebe, A. : Vitamin E of platelet and plasma lipoproteins in diabetes mellitus. In "*Clinical and nutritional aspects of vitamin E*" Hayaishi, and Mino, M. (eds.), Vol.1, p.333(1987)
30. Vatassery, G. T., Morley, J. E. and Kuskowski, M. A. : Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **37**, 641(1983)
31. 박연희, 김미경, 정은정, 이양자 : 두뇌조직의  $\alpha$ -tocopherol에 관한 연구. 한국영양학회지, **23**, 108(1990)
32. Losowsky, M. S., Kelleher, J., Walker, B. E. and Smith, C. L. : Intake and absorption of tocopherol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **203**, 212(1972)
33. Krahl, M. E. : Incorporation of C14 amino acid into glutathione and protein of normal and diabetic rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **200**, 99(1963)
34. Gandi, C. R. and Chowdhury, D. R. : Effect of diabetes mellitus on sialic acid and glutathione content of human erythrocytes of different ages. *Indian J. Exp. Biol.*, **17**, 585(1979)

(1997년 10월 25일 접수)