

당뇨 KK마우스에서 비타민 E 보강식이가 신장 당화단백질 생성에 미치는 영향

안현숙 · 박성연 · 김해리

서울대학교 식품영양학과

Effects of Vitamin E Supplementation on Renal Glycosylation Products in Diabetic KK Mice

Ahn, Hyun Sook · Park, Sung Yeon · Kim, Harriet

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

ABSTRACT

We investigated the effects of vitamin E supplementation on protein glycosylation in early and end stage product, and light microscopic studies were done on the renal glomeruli of KK-mice of various ages and various duration of diabetes. Weaned KK-mice were fed high fat diets containing 20% corn oil(wt/wt), and sacrificed at 4, 6, and 9 months of age. The high vitamin E diet was a high fat diet supplemented with an excess amount of dl- α -tocopheryl acetate (2080IU/kg diet). We measured Hemoglobin A_{1c}(HbA_{1c}) as a glycosylation early product, and renal collagen-linked fluorescence as a glycosylation end product. In the diabetic group, levels of HbA_{1c} were increased within 2 months after onset of diabetes and remained at a constant level for the duration of experiment. 5 months after onset of diabetes, renal collagen linked fluorescence(CLF) was markedly increased. A quantitative, morphologically demonstratable, progressive thickening of the basement membrane and calcification occurred in the diabetic KK-mice. There is a statistically positive correlation between CLF and histologic grade of diabetic nephropathy. Hepatic vitamin E levels correlated with those of HbA_{1c}, renal CLF, and renal calcification. Treatment with vitamin E did not modify the level of blood glucose. However, we observed a significant lowering of CLF and HbA_{1c} in diabetic mice. Supplementation of vitamin E was found to delay the progression of diabetic nephropathy. (*Korean J Nutrition* 31(6) : 1024~1030, 1998)

KEY WORDS : high vitamin E supplementation · glycosylation early product · glycosylation end product · diabetic nephropathy.

서 론

당뇨 환자의 경우 비효소 당화 반응에 의해 단백질이 쉽게 변성되며 이로인해 조직이 손상, 합병증이 유발된다. 비 효소 당화 반응이란 체내 포도당의 aldehyde 반응기와 아미노산의 N-terminal, 또는 단백질의 lysine

채택일 : 1998년 7월 8일

residue의 ϵ -amino기가 가역적으로 빠르게 반응하여 비효소적으로 포도당과 amino기가 결합하게 된다. 이 반응을 통해서 생성되는 Schiff base는 좀 더 안정한 ketoamine형태로 천천히 재배열(Amadori rearrangement)되고 이 amadori 산물이 체내에 오래 머물게 되면 탈수, 재배열 과정을 통해 최종당화산물(AGE, advanced glycosylated end product)이 형성된다¹⁾. 이 최종 당화산물에서 나오는 특이적인 형광성이 비당

노취에 비해 당뇨취의 안구 정맥에서 2.6배 증가됨이 알려졌다. lens protein, renal cortex에서도 비슷한 정도의 결과를 보였다²³⁾⁴⁾. 당화 반응은 당뇨환자 뿐만 아니라 정상인에게도 일어날 수 있으나, 당뇨 환자의 경우 이 반응이 매우 빠르게 일어나, 당뇨 합병증 유발에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 이 반응은 단백질이나 설탕에 결합할 수 있는 물질 또는 항산화제에 의해 억제될 수 있다고 제안되고 있다. Aspirin, lysine, aminoguanidine이 당화 반응 저해제로 제시되나, 안전성과 유용성이 문제되고, 또한 aminoguanidine은 advanced glycosylation 생성물에만 영향을 준다⁵⁻⁷⁾. 비타민 E는 포도당 자동 산화를 방해하여 단백질 당화를 감소시키고 동시에 포도당 자동 산화와 당화 단백질에 의해 생성된 free radical에 대해 scavenger로 작용할 수 있다. 그러므로 비타민 E는 비효소적 당화 반응에 의한 손상과 산화적 스트레스를 제한함으로써 당뇨 합병증 예방과 치료에 효과적일 수 있다고 제시되었다⁵⁻⁸⁾.

제 2형 당뇨 환자에게 비타민 E를 900mg/day씩 4개월간 투여시 placebo군에 비해 plasma GSSG-GSH 비를 감소시키고 HbA_{1c} 농도도 감소시켰다⁹⁾. 또 다른 실험에서는 1200mg/day와 600mg/day의 비타민 E를 당뇨환자에게 2개월간 투여시 투여 전과 비교할 때 혈당엔 변화가 없었으나 HbA_{1c}와 glycosylated plasma protein은 유의적으로 감소되었다⁵⁾. 이렇듯 비타민 E가 당뇨시의 비효소적 당화과정에 미치는 영향은 주로 초기당화산물의 감소에 있는 것으로 제시되어진 연구들이 많다.

당뇨병성 신증의 초기 변화는 신사구체의 비대, 신사구체 기저막의 비후, 메산지움의 증식을 특징으로 하며⁹⁾ 부분적으로 고혈당이나 고혈당에 의한 단백질의 비효소성 당화과정(nonenzymatic glycosylation)의 결과에 의해서 초래된다고 생각된다¹⁰⁾.

본 연구에서는 제 2형 당뇨병의 동물 모델인 KK 마우스를 사용하였는데, KK 마우스는 일본에서 처음 개발된 Japanese KK 마우스와 이를 C57BL/6 종과 교잡시킨 Toronto-KK(T-KK) 잡종 마우스, 이외의 몇 가지 종으로 나누어진다. T-KK 마우스의 경우 체중이 증가되면 고혈당이 나타나나, Japanese KK 마우스의 경우 당뇨병을 발전시키기 위하여서는 고칼로리 식이의 투여가 필요하다. KK 마우스의 고혈당 증세는 그다지 극심하지는 않으며, 생후 약 4개월에서 1년 사이에만 나타나는 것으로 보고되어 있다¹¹⁾. KK 마우스에서 당뇨성 사구체 경화는 기저막 비후와 사구체 간질에 기저막유사물질의 축적으로 관찰되며, 이런 변화는 2개월부터 나타난다고 보고되었다¹²⁾.

본 실험은 KK 마우스에 고지방 식이를 섭취시켜 당뇨를 유발하고, Maillard반응의 초기 산물인 Hemoglobin A_{1c}(HbA_{1c})와 후기 산물에서 나오는 CLF(collagen-linked fluorescence)가 증가하는지 확인하고, 당뇨병에 의해 증가되는 Maillard 반응이·비타민 E의 투여로 억제되는지 관찰하고자 하였다. 또한 신장의 사구체 기저막비후 및 석회화 정도를 측정하여 당뇨병성 신증 발현에 비타민 E가 억제 효과가 있는지 알아 보았다.

재료 및 방법

1. 실험 식이 및 당뇨 유도

생후 4주째인 KK 마우스를 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 공급받아 1개월간 일반 교형사료(삼양사)를 먹이면서 사육하였다. 그 후 고지방, 저비타민 E 식이군(이하 저비타민 E 식이군)과 고지방, 고비타민 E 식이군(이하 고비타민 E 식이군)으로 나누어 8주간 사육하고 혈당을 측정하여 정상군과 당뇨군으로 나누고 계속 사육하면서 4개월, 6개월, 9개월에 희생시켰다.

저비타민 E 식이(fat 20% wt/wt, 39% cal/cal)의 조성은 Table 1과 같다. 이 저비타민 E 식이의 비타민 E 수준은 51IU/kg diet이다. 이는 옥수수 기름에 들어 있는 α-tocopheryl acetate 양으로부터 기인된 것이며, 비타민 E free 비타민 혼합물은 ICN(ICN Biochemical, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 또 고비타민

Table 1. Composition of experimental diet

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

- 1) Composition of mineral mixture/kg mixture)
CaHPO₄ 500g, NaCl 74g, K₂SO₄ 52g, potassium citrate monohydrate 220g, manganous carbonate 3.5g, ferric citrate 6.0g, zinc carbonate 1.6g, cupric carbonate 0.3g, KIO₃ 0.01g, KCr(SO₄)₂ · 2H₂O 0.55g, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01g, sucrose, finely powdered 118.9g
- 2) Vitamin E free mixture, ICN Biochemicals(Cleveland, Ohio)/(kg mixture)
Vitamin A acetate(500,000IU/g) 1.8g, vitamin D₃(850,000IU/g) 0.125g, ascorbic acid 45g, inositol 5g, choline chloride 75g, menadione 2.25g, p-aminobenzoic acid 5.00g, niacin 4.25g, riboflavin 1.00g, pyridoxine hydrochloride 1.0g, thiamine 1.00g, calcium pantothenate 3.00g, biotin 0.02g, folic acid 0.09g, vitamin B₁₂ 0.00135g, sucrose, finely powdered to 1kg

E 식이에는 dl- α -tocopheryl acetate(Sigma Chemical, USA)를 첨가하여 비타민 E의 수준은 2080IU/kg diet로 하였다.

실험기간 동안 사육환경은 온도 20~25°C를 유지하였으며 습도는 60%로, 명암주기는 12시간 간격으로 유지하였다.

2. 당뇨 판정

저비타민 E 식이로 사육한지 1개월후부터 혈당을 측정하기 시작하였다. 월2회 아침 9:00~10:00 사이에 꼬리 정맥에서 혈당을 측정하여 200mg/100ml 이상이면 당뇨병으로 판정하였다¹³⁾. 혈당은 혈당 감지기(Blood glucose sensor, Medisense, Inc., Waltham, MA, U.S.A.)로 측정하였는데, 4개월에 정상군과 당뇨군으로 나누어서 각각 9개월까지 사육하였다. 4개월에는 정상이었다가 실험기간 도중 당뇨가 발생된 것은 정상군에서 제외시켰고, 4개월에 당뇨가 발생된 것만 당뇨군으로 분류 후 실험에 이용하였으므로 당뇨군 6개월은 당뇨 발생 후 2개월, 당뇨군 9개월은 당뇨 발생 후 5개월이 된다.

3. 시료수집 및 분석

실험동물은 희생시키기 전 18시간동안 금식을 시켰다. 실험동물은 생후 4개월, 6개월, 9개월에 decapitation 방법으로 희생하였고 희생시키기 전 혈당과 체중을 측정하였다. 간과 신장 조직을 적출하여 차가운 생리 식염수에 세척한 후, 흡수지로 물기를 제거하고 액체질소로 급속냉동시킨 후 냉동 보관했다가 분석에 사용하였다. 혈액은 EDTA가 들어있는 tube에 받아 충분히 혼합한 후 냉동보관하였다. HbA_{1c}의 측정은 micro column test kit(Hemoglobin A_{1c} Micro Column Test, BIO-RAD, California, USA)를 이용하였다. CLF의 측정은 Soulis-Liparota 등¹⁴⁾의 방법을 따랐다.

신장 조직을 잘게 다진 것에 50mM potassium phosphate buffer를 넣고 2분간 균질하였다. 이 균질액을 4°C, 19,872×g에서 30분간 원심분리하여, 상층액은 버리고 남아있는 pellet에 chloroform-methanol 용액을 5ml씩 넣고 24시간 동안 4°C에서 mild shaking하였다. Chloroform-methanol 용액을 제거하고 pellet을 methanol과 탈이온수로 4번씩 씻어낸 후, pellet을 pepsin(pepsin 0.1g/100ml acetic acid)이 들어있는 acetic acid 용액에 부유시켜 18시간동안 4°C에서 냉장시켜 collagen 외의 물질들을 제거시켰다. Acetic acid 용액을 제거시키고 pellet을 0.1M CaCl₂, 0.02M Tris-HCl과 0.05% toluene으로 2번씩 씻었다.

Pellet에 enzyme solution(collagenase, proteinase K)을 4ml씩 넣고 chloroform과 toluene을 1방울씩 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 72시간동안 가온하였다. 그 후 4°C, 19,872×g에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 spectrofluorometer를 이용해 excitation 370nm, emission 440nm에서 형광도를 측정하였다. 표준 용액은 Quinine sulfate 0.01 mg을 0.1N H₂SO₄ 10ml에 녹여서 meter multiplier가 0.3일 때 fluorescence intensity를 90unit로 하였다.

CLF를 측정된 상층액에서의 단백질 정량은 Smith 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 하고, 표준용액으로는 bovine serum albumin을 사용하였으며 형광도는 arbitrary unit(AU)/mg protein 으로 나타내었다.

4. 간 조직내 비타민 E 함량 측정

간 조직내 비타민 E 함량은 Furr 등¹⁶⁾의 방법으로 정량하였다. 수분을 제거할 목적으로 간 조직무게 3배의 anhydrous sodium sulfate를 가하여 마쇄한 다음 HPLC용 dichloromethane을 가하여 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이어서 하층 부위에 dichloromethane을 가하여 동일한 방법으로 추출을 수회 반복하였다. 최종상층액을 pore size 0.45 μ m의 membrane filter(Hamilton, USA)로 여과시킨 다음, 질소 가스하에서 농축시켰다. 최종시료를 diethylether-methanol로 용해시킨 후 HPLC에 주입시켰다. Column은 μ -Bondapak C₁₈을 사용하였고 detector는 UV 280nm, intergrator는 Waters 746을 사용했다. 용출액은 methanol : H₂O(95 : 5)을 사용하였으며 용출액의 흐름 속도는 1.5ml/min, sample injection량은 30 μ l로 하였다.

5. 신장 조직의 광학 현미경 관찰

10% 완충 포르말린에 고정하여 에틸 알콜 탈수 과정을 거쳐 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하고 3 μ m 두께로 세절하여 hematoxylin-eosin 염색, periodic acid-schiff 염색 및 Masson's trichrome 염색을 각각 실시하여 관찰하였다¹⁷⁾. 각 신장 조직에서 100개의 사구체를 검사하여 기저막의 비후 사구체 경화, 메산지움의 세포증식 등을 관찰하여 이러한 사구체 변화가 보이지 않는 것은 grade 0로, 10개에서 20개 사이를 grade 1로, 20개에서 30개 사이는 grade 2로, 30~40개 사이는 grade 3으로, 40개 이상일 때는 grade 4로 표시하였다.

또한 사구체 전체를 관찰하였을 때, 석회화가 5% 미만인 것은 grade 0, 5~10%는 grade 1, 10~30%는 grade 2, 30% 이상은 grade 3으로 표시했다.

6. 통계처리

각 분석치는 평균±표준 편차로 제시하였다. 각 실험 군간의 유의도 검증은 Tukey's HSD test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였고, 각 지표간의 유의성을 알아 보기 위해서는 대조군과 T-test를 실시하였고, 각 지표들간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient로 알아보았다.

결과 및 고찰

1. 혈당과 간의 비타민 E 함량 변화

혈당의 변화는 Fig. 1과 같다. 희생하기 전 18시간 금식후 측정된 혈당은 4개월, 6개월, 9개월에 정상군에서는 83, 86.2, 86mg/100ml이었고, 당뇨군에서는 180, 156.3, 127.5mg/100ml 이었다. T-test를 실시하였을 때 고비타민 E 식이에 의해 공복시 혈당에 유의적인 차이는 없었다. 본 연구 결과는 KK-마우스의 고혈당 증세는 그다지 극심하지 않으며 생후 4개월에 나타나 9~12개월까지 유지된다고 하는 보고¹⁸⁾와 일치된다. Camerini-Davalos 등¹⁹⁾에 의하면 가장 높은 혈당치는 2~6개월된 KK 마우스에서 발견되었고, 더 나이는 마우스에서는 당내인성이 향상되었다고 하였다.

간의 비타민 E 함량변화는 Fig.2와 같다. 저비타민 E 식이섭취시, 비당뇨군에서는 월령이 증가하여도 비타민 E의 함량 변화는 없었다. 당뇨 발생에 의해 비타

민 E 함량은 감소되었고, 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 보고되었다²⁰⁾. 당뇨병 유발로 유리 라디칼이 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 추정된다²¹⁾ Higuchi²²⁾가 Wistar rat에 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 후 당뇨 후 1주, 2주, 20주 후에 희생시켜서 실험을 하였을 때, 간의 α -tocopherol양은 당뇨군에서 감소되었고, 당뇨 20주에는 비당뇨군의 8.1% 수준이 되었다고 하였다.

고비타민 E 식이 섭취시 비당뇨군에서는 저비타민 E 식이를 섭취한 비당뇨군에 비하여 비타민 E 함량이 증가되었는데 그 효과는 6개월군에서부터 나타나기 시작하였다. 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 당뇨가 발생되어도 비타민 E 함량은 급격히 감소되지 않았다.

2. 당뇨 유도에 의한 변화

Table 2에는 Millard 반응 초기 생성물인 HbA_{1c}와 후기 생성물인 신장조직의 CLF의 변화를 나타내었다. 정상군에서는 월령이 증가하여도 HbA_{1c}의 양은 변화

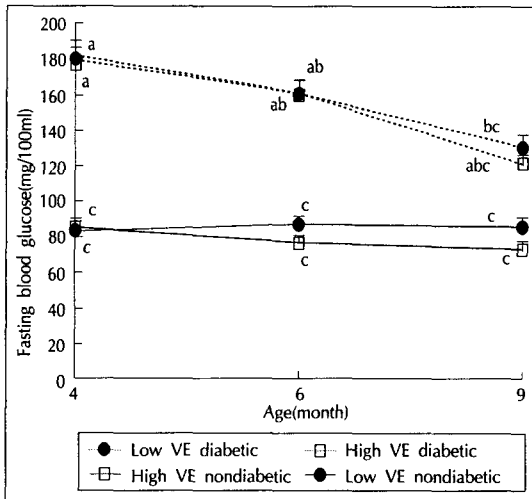


Fig. 1. Effects of vitamin E supplementation on fasting blood glucose in nondiabetic and diabetic KK mice. Values are mean±SD of 8 KK mice. Low VE : High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE : High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080 IU VE/kg diet). Means with the same alphabets are not significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

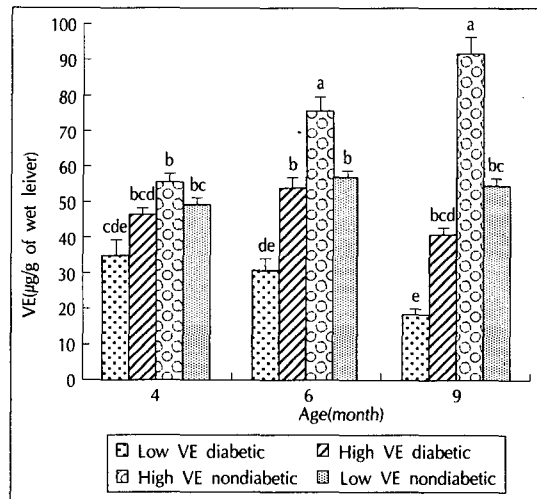


Fig. 2. Effects of vitamin E supplementation on hepatic vitamin E in nondiabetic and diabetic KK mice. Low VE : High fat, low VE diet(corn oil 20%, 51IU VE/kg diet). High VE : High fat, high VE diet(corn oil 20%, 2080IU VE/kg diet). Means with the same alphabets are not significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. Values are mean±SD, n=5-9.

Table 2. Effects of vitamin E supplementation on HbA_{1c} and Renal CLF in nondiabetic and diabetic KK-mouse

Group	Age (mon)	HbA _{1c} ¹⁾ (%)	Renal CLF ²⁾ (Au/mg protein)
No-diabetic	Low LE	4	2.50 ± 0.28 ^{bcd}
		6	2.48 ± 0.46 ^{bcd}
		9	2.20 ± 0.10 ^{cde}
	High VE	4	2.58 ± 0.39 ^{bcd}
		6	2.41 ± 0.34 ^{bcd}
		9	1.56 ± 0.54 ^e
Diabetic	Low LE	4	3.00 ± 0.50 ^{bc}
		6	4.61 ± 0.45 ^a
		9	4.32 ± 0.52 ^a
	High VE	4	2.23 ± 0.20 ^{cde}
		6	3.27 ± 0.67 ^b
		9	2.06 ± 1.08 ^{de}

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

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

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

Values are mean ± SD of 8 KK mice.

1) Hemoglobin A_{1c}, 2) Collagen linked fluorescence

되지 않았는데, 당뇨 발병후 2개월이 경과된 6개월부터 HbA_{1c}가 증가되었다. 그러나, 당뇨가 진행되어도 HbA_{1c}수준은 더 이상 증가되지 않았다. HbA_{1c}는 당화초기 산물로서 마우스에서는 Hb의 반감기가 20일 정도이므로²³⁾ 20일간의 평균 혈당치를 반영하기 때문에 당뇨 2개월부터 증가되기 시작하였고, 또한 HbA_{1c}가 탈수, 재배열 과정을 통해서 최종 당화산물로 되기 때문에 당뇨가 진행되어도 계속 HbA_{1c}의 양이 증가되지는 않는 것으로 사료된다.

신장 조직의 CLF의 변화는 Table 2에서 나타난 바와 같이 저비타민 E 식이 섭취시 4개월, 6개월, 9개월 군에서 CLF는 각각 2.73, 5.60, 8.81 AU/mg protein의 값을 나타내어서 정상군에서 월령이 증가되면서 증가되었으며, 9개월에는 4개월의 3.2배가 되었다. 당뇨군에서는 당뇨발생에 의해서 CLF는 증가되지 않았다. 그러나 9개월에 급격한 증가를 나타내어서 4개월 당뇨군의 5.3배, 9개월 정상군의 2.6배로 증가되었다. 노화에 의한 증가보다 당뇨에 의한 증가가 더 크다는 것을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서 AGE를 측정하기 위해 선택한 collagen은 결합조직과 기저막에 주로 존재하는 섬유상 단백질로 포유동물 구성 단백질 중에서도 양이 가장 많다²⁴⁾. Kohn등²⁵⁾은 노화 현상은 collagen함량이 높은 조직에서 현저하게 진행되기 때문에 나이가 들어감에 따라 파

Table 3. Effects of vitamin E supplementation on histologic grade in nondiabetic and diabetic KK-mouse

Group	Age (mon)	Basement membrane thickening and Clomerular sclerosis	Calcification
No-diabetic	Low LE	4	0.6 ± 0.5 ^d
		6	0.4 ± 0.5 ^d
		9	0.3 ± 0.5 ^d
	High VE	4	1.0 ± 0.5 ^{cd}
		6	1.1 ± 0.6 ^{cd}
		9	0.8 ± 0.9 ^d
Diabetic	Low LE	4	2.4 ± 0.5 ^{ab}
		6	2.7 ± 0.5 ^{ab}
		9	3.4 ± 0.5 ^a
	High VE	4	2.0 ± 0.9 ^{bc}
		6	2.0 ± 0.8 ^{bc}
		9	2.1 ± 0.9 ^{bc}

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

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

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

Values are mean ± SD of 8 KK mice.

부, 동맥, 허파 및 관절에서의 탄력성이 현저한 감소를 보이는 것이라고 하였다. Monnier등은²⁶⁾ 정상 collagen에서도 노화에 따라 Maillard 반응의 최종산물 축적이 일어나지만 당뇨병에 의해서 더 가속화된다고 보고하였는데, 본 연구에서도 노화에 의한 증가보다 당뇨에 의한 증가가 더 현저함을 관찰할 수 있었다.

신장조직을 적출하여 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 저비타민 E 식이를 섭취시킨 경우, 사구체 기저막비후는 정상군에서 거의 관찰되지 않았다. 그러나 당뇨군에서는 기저막 비후가 관찰되어 당뇨가 진행되면서 계속 증가되었다(2.42~3.42). 또한, 석회화는 정상군에서 거의 관찰되지 않았다. 당뇨군에서는 석회화가 관찰되었고(1.71~3.42) 특히 당뇨 5개월인 9개월군에서 심하게 관찰되었다.

신장의 CLF는 사구체 기저막 비후, 석회화에 대해 각각 $r=0.63(p<0.001)$, $r=0.67(p<0.001)$ 의 상관관계를 나타내었고, 반면 HbA_{1c}는 사구체 기저막 비후와 석회화에 대해 유의적인 상관관계를 나타내지 않았는데 이는 Maillard반응의 초기 산물인 HbA_{1c} 보다 후기 산물인 CLF가 신장 병변과 더 높은 상관관계를 나타냄을 보여준다고 사료된다. 간의 비타민 E 함량은 신장 CLF, 석회화에 대해 각각 $r=-0.74(p<0.001)$, $r=-0.67(p<0.01)$ 의 상관관계를 나타내어서 간의 비타민 E증가가 신장의 CLF증가 및 석회화에 대해 억제효과를 나타냄을 보여주었다.

3. 비타민 E 식이 섭취에 의한 변화

HbA_{1c}는 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 정상군에서는 저비타민 E 식이를 섭취한 정상군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았으나 당뇨군에서는 저비타민 E 식이를 섭취한 당뇨군에 비해 유의적으로 감소되었다(Table 2). 9개월군(당뇨 5개월)에서 고비타민 E 식이 섭취시 HbA_{1c}가 2.06±1.08%로 고비타민 E 식이를 섭취하지 않은 당뇨군의 HbA_{1c}값인 4.32±0.52%에 비해 52% 가량 감소되어 있었다. 신장 조직의 CLF를 측정하였을 때, 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 정상군에서는 고비타민 E 식이에 의한 효과를 볼 수 없었으나 당뇨군에서는 9개월부터 감소 효과를 나타내었다(Table 2). 9개월군(당뇨 5개월)에서 고비타민 E 식이 섭취시 CLF가 13.39±1.95 AU/mg protein으로 고비타민 E 식이를 섭취하지 않은 당뇨군의 CLF값인 23.34±6.66 AU/mg protein에 비해 43% 가량 감소되어 있었다. 지금까지 비타민 E가 당뇨시의 비효소적 당화 과정에 미치는 영향은 주로 초기 당화산물의 감소에 있는 것으로 제시되어진 연구들이 많으나 본 실험의 결과는 KK 마우스에서 비타민 E가 초기 당화산물뿐 아니라 후기 당화산물도 감소시킴을 제시하였다. 비타민 E가 HbA_{1c}, 즉 초기 당화산물 형성을 억제하는 기전은 확실치 않으나 Hunt 등²⁷⁾에 따르면 포도당의 자동산화 과정 중 생성되는 enediol radical anion을 비타민 E가 enediol로 다시 환원시켜 포도당의 자동산화 과정을 억제해 amadori 산물을 감소시킨다고 했다. 따라서 비타민 E는 포도당 자동 산화를 방해하여 단백질 당화를 감소시키고 동시에 포도당 자동 산화와 당화 단백질에 의해 생성된 free radical에 대해 scavenger로 작용할 수 있기 때문에 비타민 E는 비효소적 당화반응에 의한 손상과 산화적 스트레스를 제한함으로써 당뇨 합병증 예방과 치료에 효과적일 수 있다고 사료된다.

당화반응 억제제로서 aminoguanidine에 대한 연구가 많이 진행되었는데 aminoguanidine은 *in vivo*와 *in vitro*에서 collagen의 교차 결합을 저해하고, 최종 당화산물 축적을 감소시키는 효과가 있음이 보고되었다²⁸⁾. 그러나, aminoguanidine이 포도당으로부터 H₂O₂를 생성하며 catalase를 저해한다는 결과도 제시되고 있다²⁹⁾ 또 신장 병변의 변화는 Table 3에서 보는 바와 같이 정상군에서는 고비타민 E 식이 효과가 관찰되지 않았으나, 당뇨군에서는 고비타민 E 식이를 섭취한 경우 사구체 기저막비후 및 석회화가 감소되었다.

본 실험에서는 KK 마우스에서의 당뇨에 의한 초기 및 후기 당화 산물의 축적이 고비타민 E 식이에 의해 억제되었음을 확인하였고, 사구체 기저막 비후 및 석회화

가 감소되었음을 관찰하였다. 이는 당뇨 합병증을 예방하는 목적으로 비타민E의 사용 가능성을 제시해주는 것으로 사료된다.

요 약

KK마우스에 고지방 식이를 섭취시켜 당뇨를 유발하고, Maillard 반응의 초기산물인 HbA_{1c}와 후기 산물인 신장조직의 CLF가 증가되는지를 확인하고, 당뇨병에 의해 증가되는 Maillard 반응이 비타민 E의 투여로 억제되는지 관찰하였다. 또 신장조직의 광학 현미경 관찰을 통하여 신장병변을 검사하였다. 이유즉시 KK 마우스를 1개월간 pellet diet로 적응시킨 후 저비타민 E 식이(corn oil 20%, wt/wt)를 먹여 당뇨를 유도하였다. 비타민 E 보강은 2080IU/kg diet 수준으로 하였으며, 생후 4개월, 6개월, 9개월(당뇨 0개월, 2개월, 5개월)에 희생시켰다. 정상 KK-마우스에서는 월령이 증가하였을 때, 혈당과 HbA_{1c}는 유의적인 변화를 보이지 않았으나 신장조직의 CLF는 점진적으로 증가되었다. 당뇨군에서 HbA_{1c}는 6개월에서 증가되기 시작하였고 9개월군과 차이가 없었으며, 신장조직의 CLF는 9개월군에서 급격히 증가하였다. 또 고비타민 E 식이를 섭취시킨 경우 당뇨군에서 초기 및 후기 Maillard 반응생성물의 감소가 관찰되었다.

이상의 결과로부터 KK 마우스에서는 월령이 증가함에 따라 초기 및 후기 당화산물의 축적과 신장 병변의 변화가 관찰되었고, 또한 당뇨 유발에 의해 이 변화들은 더욱 촉진되었으나, 2080IU/kg diet 수준의 고비타민 E 식이를 섭취시켰을 때 이런 변화들이 억제되었음을 확인하였다.

Literature cited

- 1) Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46 : 223-234, 1995
- 2) Hammes HD, Martin S, Fedesrlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibit the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Nat Acad Sci USA* 88 : 11555-11558, 1991
- 3) Nakayama H, Mitsuhashi T, Kuwajimas. Immunochemical detection of advanced glycation end product in lens crystallins from streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 42 : 345-350, 1993
- 4) Brownlee M, Cerami A, Vassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318 : 1315-1321, 1988

- 5) Ceriello A, Quatraro A, Gagliano D. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabetic Med* 9 : 297-299, 1992
- 6) Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefevre P J. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes care* 14 : 68-72, 1991
- 7) Nicholls K, Mandel TE. Advanced glycosylation end-products in experimental murine diabetic nephropathy. Effect of islet isografting and of aminoguanidine. *Lab Invest* 60 : 486-491, 1989
- 8) Paolisso G, D'Amore A. Pharmacological doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetes patients. *Am J Clin Nutr* 57 : 650-656, 1993
- 9) Osterby R. Early phases in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta Med Scand(Suppl)* 574 : 73-82, 1972
- 10) Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 101 : 527-537, 1984
- 11) Dulin WE, Wyse BM. Diabetes in the KK-mouse. *Diabetologia*:317-323, 1970
- 12) Wehner H, Hohn D, Faix-Schade U, Huber H, Wazlser P. Glomerular changes in mice with spontaneous hereditary diabetes. *Lab Invest* 27(3) : 331-340, 1972
- 13) Yi K N, Rhee C S. Clinical Pathology File. pp.90-91, Eu-Hak MunHwaSa, Seoul. 1990
- 14) Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 40 : 1328-1334, 1991
- 15) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Drovencano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 : 76-85, 1985
- 16) Furr HC, Amedee-Manesme O, Olson JA. Gradient reversed-phased high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring retinoids. *J Chromatogr* 309 : 299-312, 1984
- 17) Osterby R, Gundersen HJG. Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 18 : 493-500, 1983
- 18) Taketomi S, Ikeda H, Iwatsuka H. Determination of overall insulin sensitivity in diabetic mice KK. *Horm Metabol Res* 14 : 14-18, 1982
- 19) Camerini-Davalos RA, Oppermann W, Mittl R, Ehrenreich T. Studies of vascular and other lesions in KK mice. *Diabetologia* 6 : 324-329, 1970
- 20) Vatassery GT, Morley JE, Kuskowski MA. Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am J Clin Nutr* 37 : 641-644, 1983
- 21) Matkovic B, Barage SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolizing enzymes. *Horm Met Res* 14 : 77-79, 1982
- 22) Higuchi Y. Lipid peroxides and α -tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Med Okayama* 36(3) : 165-175, 1982
- 23) Berlin N, Berk P. The biological life of the red cell. In : Surgenor DM, ed. *The red blood cell* II. p991-1005, Academic Press New York, 1975
- 24) Bonar LC, Lees S, Mook HA. Neutron diffraction studies of collagen in fully mineralized bone. *J Mol Biol* 181 : 265-270, 1985
- 25) Kohn RR, Monnier VM. Normal aging and its parameters. In : Swift CG, ed. *Clinical Pharmacology in the Elderly*. p3, Marcel Dekker Inc. New York, 1987
- 26) Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 81 : 583-587, 1984
- 27) Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and antioxidative glycosylation. *Biochem J* 256 : 205-212, 1988
- 28) Ou P, Wolff S. Aminoguanidine : A drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem Pharmacol* 46 : 1139-1144, 1993
- 29) Odetti PR, Borgglio A, Pascal AD, Rolandi R, Adezati L. Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutin. *Diabetes* 39 : 796-801, 1990