

# 당뇨쥐 신장조직의 산화적 손상과 사구체 여과율에 미치는 비타민 E의 영향

곽 오 계 · 이 순 재\*<sup>§</sup>

대구과학대학교 간호학과, 대구효성가톨릭대학교 식품영양학과<sup>†</sup>

## Effects of Vitamin E on the Oxidative Damage and Glomerular Filtration Rates of Kidney in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Kwag, Oh Gye · Rhee, Soon Jae\*<sup>§</sup>

Department of Nursing Science, Taegu Science College, Taegu 702-722, Korea

Department of Food Science and Nutrition,\* Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan 713-702, Korea

### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of vitamin E on the oxidative damage and glomerular filtration rates(GFR) of kidney in streptozotocin(STZ) induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats weighing  $100 \pm 10$ gm were randomly assigned to one normal and three STZ-induced diabetic groups, which were subdivided into vitamin E free diet(DM-0E group), 40mg vitamin E per kg diet(DM-40E group) and 400mg vitamin E per kg diet(DM-400E group). Vitamin E level of normal group was 40mg per kg diet. Diabetes was experimentally induced by intravenous injection of 55mg/kg of body weight of STZ in citrate buffer(pH 4.3) after 4 weeks feeding of experimental diets. Animals were sacrificed at the 6th day of diabetic states. Activities of xanthine oxidase(XOD) in DM-0E, DM-40E and DM-400E groups were significantly increased by 133%, 110%, and 74%, respectively, compared to normal group. The contents of microsomal superoxide radical( $O_2^{\cdot-}$ ) in kidney were 106% and 119% higher of DM-0E and DM-40E groups than normal group, respectively, but that of DM-400E group was similar to normal group. The level of urinary microalbumin in DM-0E group was increased as 5 times much as normal group at the 6th day. Those of DM-40E and DM-400E groups were decreased to 16% and 36%, respectively, compared to DM-0E group. The content of urinary  $\beta_2$ -microglobulin in DM-0E, DM-40E, and DM-400E groups were increased by 268%, 181%, and 163%, respectively, compared to normal group. GFR in DM-0E and DM-40E were significantly increased, but was not significantly different from DM-400E groups compared to normal group. In conclusion, the supplementation of dietary vitamin E reduced peroxidative damage of renal glomerular and renal dysfunction in diabetic rats. (*Korean J Nutrition* 33(6) : 625~631, 2000)

**KEY WORDS**: kidney of diabetic rats, xanthine oxidase, oxidative damage, GFR, vitamin E.

### 서론

당뇨병은 특히 선진국과 개발도상국에서 급증세를 보이고 있다. 우리 나라도 급속한 경제성장과 더불어 식생활의 서구화 및 생활양식의 변화 결과로 당뇨병 환자가 현재 성인 인구의 8~10%에 도달하고 있다.

당뇨병 환자에서는 거의 대부분 눈, 신경 및 신장 등의 병변과 심혈관계 질환을 동반한다. 따라서 당뇨 환자에서의 합병증으로는 시력장애, 백내장, 실명과 신부전, 및 신경장해, 뇌졸중, 심근경색, 동맥경화 등의 혈관성 합병증 발생을

이 높으며 결국 이러한 합병증으로 인해 사망하게 된다. 이들 합병증 중에서 우리 나라는 신장질환으로 인한 사망율이 높다고 보고되고 있으나<sup>1)</sup> 그 심각성에 비해 이에 대한 병리기전과 관련된 영양학적 측면에서의 연구는 아직까지 미흡한 상태이다.

당뇨병성 만성 합병증 발생과 관련된 최근 연구<sup>2)</sup>에서 산화적 스트레스와 깊은 관련이 있다는 견해가 주목을 끌고 있다. 당뇨병에서는 고혈당의 지속화와 만성화로 여러 가지 자유 라디칼(free radical)의 생산이 증가되고, 반응성이 높은 이들 물질에 의해 혈관 내피세포가 손상되면서 동맥경화를 비롯한 각종 혈관성 합병증이 발생된다고 보고되고 있다.<sup>3)</sup> 이러한 요인에 대한 다각적인 실험 동물 모델과 당뇨병 환자 연구에서 다양한 항산화 방어기전의 활성 변화가

채택일 : 2000년 8월 10일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed

관찰되었다.<sup>4)</sup> 고혈당에 의한 산화성 스트레스를 방어해 내기에는 항산화 효소의 양과 활성이 불충분하고, 또한 그들 효소 사이에 유지되고 있던 균형 상태가 깨지는 것 또한 중요한 병인으로 작용한다.

즉 당뇨병과 같은 병리적 상태에서는 자유 라디칼 생성 자체의 증가와 이에 대한 방어 기전의 저하로 산소 자유 라디칼에 의한 조직 손상의 가능성이 높으며, 이러한 자유 라디칼 발생은 만성합병증 발생에 관여하는 주요 기전 중의 하나로 본다.<sup>6)</sup> 실제로 콕 등<sup>7)</sup>은 당뇨 신장조직에서도 자유 라디칼을 제거하는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSHpx) 등의 항산화계가 감소되면서 조직의 손상이 초래함을 관찰한 바 있다. 반면 이러한 자유 라디칼을 생성하는 생성계로는 mixed function oxidase system(MFO계)이나 xanthine oxidase(XOD)를 들 수 있는데 당뇨병에서는 이들 자유 라디칼 생성계가 활성화된다는 연구가 다수 보고 되고 있다.<sup>8-10)</sup> 따라서 당뇨병 환자에서는 이렇게 생성된 자유 라디칼을 제거하는 항산화계를 강화시키거나 혹은 자유 라디칼을 생성하는 생성계의 활성을 억제시키는 방안이 만성합병증에 대한 중요한 예방과 치료 방법이 될 수 있다.

한편 최근 자유 라디칼 생성을 억제하거나 혹은 제거하는 기구인 항산화기구를 강화시킬 수 있는 물질로 비타민 E, A, C,  $\beta$ -carotene 및 기타 여러 가지 항산화물질을 대상으로 한 연구가 다방면으로 진행되고 있다.<sup>11-13)</sup> 최 등<sup>12)</sup>의 당뇨쥐를 대상으로 한 연구에서 비타민 E가 간조직의 항산화계를 강화시키고 혈중 지질과산화물의 축적을 감소시킴을 보고한 바 있다. 또한 비타민 E나 catechin과 같은 항산화 물질들은 당뇨쥐 신장 조직에서 MFO와 같은 자유 라디칼 생성계를 약화시킨다고 보고 된 바 있다.<sup>13)</sup>

이러한 보고들을 미루어 볼 때 당뇨쥐에서는 산화적 스트레스에 민감하여 조직의 산화적 손상이 초래되기 쉽고 또한 당뇨병성 만성 합병증 유발율이 높고 당뇨병성 신증으로 인한 사망 순위가 높은 기관인데도 불구하고 신장조직을 대상으로 한 예방이나 치료 차원의 영양학적 연구는 미진한 상태이다.

그러므로 본 연구에서는 신장조직에서 자유 라디칼의 생성과 그로 인한 조직의 산화적 손상 및 기능적 손상을 관찰하고 이에 미치는 비타민 E의 영향을 관찰코저 하였다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 비타민 E 수준을 달리한 식이로 일정기간 사육한 후 당뇨를 유발시켜 신장조직에서의 자유 라디칼 생성체인 XOD 활성과 조직의 손상 및, 사구체 여과율에 미치는 비타민 E의 영향을 규명하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물의 사육

실험동물은 체중 100gm 내외의 Sprague-Dawley종 수컷을 대전화학연구소에서 구입하여 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반 배합사료로 일주일간 예비사육한 후, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 Table 1과 같이 비타민 E를 40mg/kg diet를 첨가한 식이를 공급하면서 당뇨를 유발시키지 않은 정상군(Normal)과 당뇨 실험군으로 나누었다(Table 1). 당뇨 실험군은 식이내 비타민 E의 급여 수준에 따라 비타민 E를 급여하지 않은 군(DM-0E), 비타민 E를 40mg/kg diet 공급한 군(DM-40E), 비타민 E를 다량 급여한 군 즉, 400mg/kg diet(DM-400E) 등 각 10마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 기본 실험 식이조성은 Table 2와 같다(Table 2). 체중은 실험기간 동안 매일 측정하고 체중증가율 및 식이효율을 계산하였다. 사육실의 온도는 20~23°C 였고, 습도는 50 ± 10%였다. 당뇨 유발은 식이내 비타민 E의 농도에 따른 식이를 4주간 공급한 후 실험동물에 streptozotocin(STZ) 55mg/kg B.W.을 신선한 0.1M sodium citrate buffer(pH 4.3)에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사하여 당뇨를 유발시켰으며 STZ 주사 후 6일째에 혈당농도가 300 mg/dl 이상인 동물만 희생하여 본 실험에 사용하였다.

### 2. 신장조직중의 Xanthine Oxidase(XOD) 활성 측정

XOD 활성의 전처리는 신장조직을 일정량을 취하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose/0.5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)/5 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfo-

Table 1. Classification of experimental groups<sup>1)</sup>

Groups	Vitamin E <sup>1)</sup> (mg/kg diet)	Streptozotocin <sup>2)</sup> (55mg/kg B.W.)
Normal	40	-
DM-0E	0	+
DM-40E	40	+
DM-400E	400	+

1) Vitamin E: dl- $\alpha$ -tocopherylacetate

2) Intravenous injection of streptozotocin(55mg/kg B.W.) in citrate buffer(pH 4.3) via tail vein

3) Normal group No streptozotocin injection after vitamin E 40mg/kg diet supplementation

DM-0E group: Streptozotocin injection after vitamin E free diet

DM-40E group: Streptozotocin injection after vitamin E 40mg/kg diet supplementation

DM-400E group: Streptozotocin injection after vitamin E 400mg/kg diet supplementation

**Table 2.** Composition of experimental diets

Ingredients	Amount(g/kg diet)
Corn starch	668
Casein <sup>1)</sup>	180
DL-methionine <sup>2)</sup>	2
Corn oil	50
Salt mixture <sup>3)</sup>	40
Vitamin mixture <sup>4)</sup>	10
Cellulose <sup>5)</sup>	50
Kcal/kg	3850

- 1) Lactic Casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Willington, N. Z.
- 2) Sigma Chem. Co.
- 3) Salt mixture, AlN-76(g/kg) calcium phosphate(CaHPO<sub>4</sub>) 500, NaCl 74, potassium citrate 220, potosium sulfate(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 52, magnesium oxide(MgO) 24, manganous carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate (KIO<sub>3</sub>) 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose 118.03
- 4) Vitamin E free mixture. contained thiamin · HCl, 0.6 g; riboflavin, 0.6 g. pyridoxin HCl, 0.7 g. nicotinic acid, 3.0 g; Ca-pantothenate, 1.6 g. folic acid, 0.2 g; biotin, 0.02 g; vitamin B<sub>12</sub>, 0.001 g; retinyl acetate, 4.0 × 10<sup>5</sup> units; ergocalciferol, 1.6 × 10<sup>5</sup> units. menadione, 0.075 g. glucose 992.5g
- 5) Sigma Chem. Co.: CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

nic acid(HEPES) 용액으로써 10%(w/v) 마쇄액을 만들어서 전보<sup>9)</sup>에서와 같은 방법으로 처리한 상층액(cytosol) 분획을 사용하여 활성도를 측정하였다. Xanthine을 기질로 하여 30℃에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 파장 292nm에서 흡광도를 측정하는 Stipe와 Della Corte의 방법<sup>10)</sup>을 이용하였다. 활성도 단위는 신장조직의 단백질 1mg이 1분 동안 반응하여 기질로부터 생성된 uric acid량을 nmole 농도로 표시하였다.

### 3. 신장조직중의 Superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 함량 측정

신장조직의 mitochondria, cytosol, microsome 분획은 Haper의 변형된 방법<sup>10)</sup>에 따라 완충용액(1.15% KCl/10mM phosphate buffer/5mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 균질화한 다음 700×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 9,000×g에서 15분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 분리한다. 이때 생긴 pellet 층에 완충용액을 2ml 부유시킨 후 1ml씩 나누어서 -80℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

Superoxide radical 함량 측정은 Azzi 등<sup>10)</sup>의 방법에 준해 50mM K.P buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 90mM succinate, 150mM KCl, 30mM KCN, 0.3mM cytochrome c 및 mitochondria 효소원을 첨가하여 최종 반응액이 3.0ml가 되게 하였다. 이 반응액을 37℃에서 2분간 반응시키면서 550nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 super-

oxide radical의 함량을 산정하였다. Superoxide radical 함량은 1mg의 단백질이 1분간 생성시킨 reduced cytochrome c의 양을 nmole로 나타내었다.

### 4. 뇨중 microalbumin 함량 측정

뇨는 STZ 유발 당뇨쥐에서 희생전 6일간 매일 24시간 동안의 뇨를 수집하였고 DPC RIA kit(U.S.A)를 사용하여 1분간  $\gamma$ -counter하여 뇨중 microalbumin을 측정하였다.

### 5. 뇨중 $\beta_2$ -microglobulin 함량 측정

STZ 유발 당뇨쥐에서 희생전 6일간 매일 24시간 동안의 뇨를 수집하여 DSL-6200 RIA kit(U.S.A)를 사용하여 1분간  $\gamma$ -counter하여 뇨중  $\beta_2$ -microglobulin을 측정하였다.

### 6. 사구체 여과율(GFR) 측정

혈청과 뇨의 크레아티닌 측정은 scidia creatinine reagent kit를 이용하였다. 혈청과 뇨의 크레아티닌 값으로부터 GFR을 구하였다.

### 7. 단백질 함량 측정

신장조직의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowery 방법<sup>11)</sup>에 의해 측정하였다.

### 8. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검정하기 위하여 분산분석(one-way ANOVA 검증)을 수행하였으며, 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's-HSD test<sup>10)</sup>에 의해 분석하였다.

## 결 과

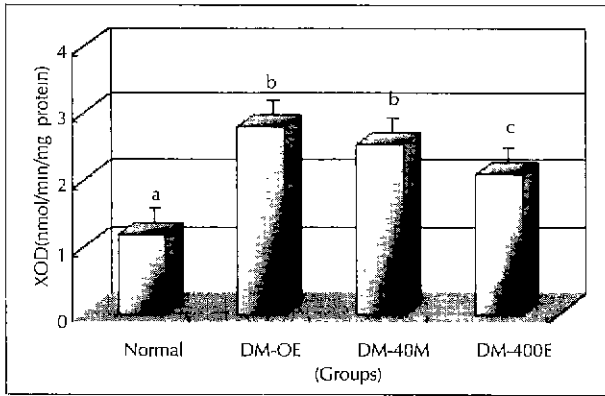
### 1. Xanthine oxidase 활성

XOD는 xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 생성하는 효소. 즉 유리기 생성계 효소로, 당뇨유발 후 6일째의 XOD의 활성을 신장조직에서 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다.

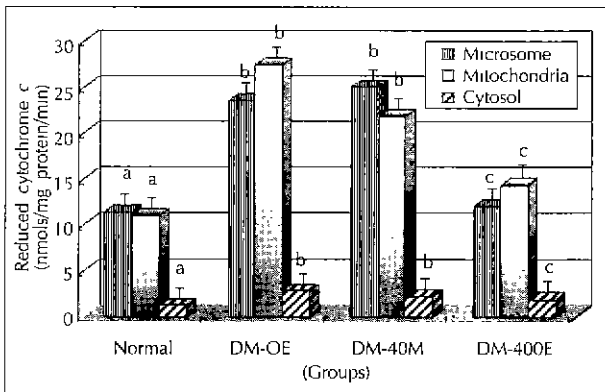
정상군에 비해 당뇨 유발군인 DM-0E, DM-40E 및 DM-400E 군에서는 각각 133%, 110%, 74% 증가되었으며 그 중에서도 DM-0E군에서 가장 높았다 그리고 비타민 E의 다량 공급군인 DM-400E군은 비공급군인 DM-0E군에 비해 25.4% 유의적으로 감소하였다(Fig 1).

### 2. Superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 함량

신장조직을 cytosol, mitochondria 및 microsome 분획별로 나누어서 각각 superoxide radical 함량을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

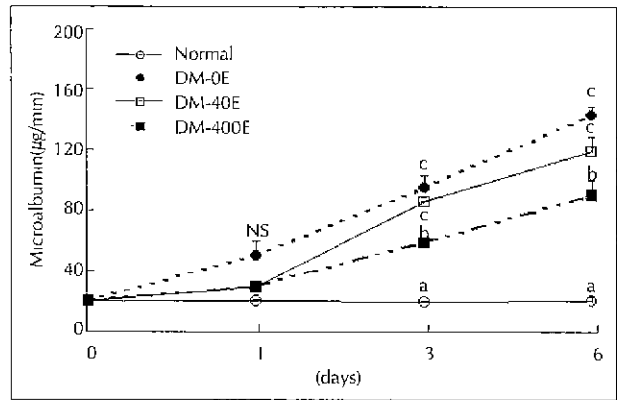


**Fig. 1.** Effects of vitamin E supplement on xanthine oxidase activity in kidney of STZ-induced diabetic rats. All values are mean  $\pm$  SE (n = 10). Bars with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's-HSD test. Normal: No STZ treatment, vitamin E supplementation (40mg/kg diet). DM-OE: STZ-induced DM rats that fed vitamin E free diet during experimental period (0mg/kg diet). DM-40E: STZ-induced DM rats that fed vitamin E free diet during experimental period (40mg/kg diet). DM-400E: STZ-induced DM rats that fed vitamin E free diet during experimental period (400mg/kg diet). \*: Normal and diabetic groups were injected with saline and 55mg STZ/100g b.w. via tail vein, respectively

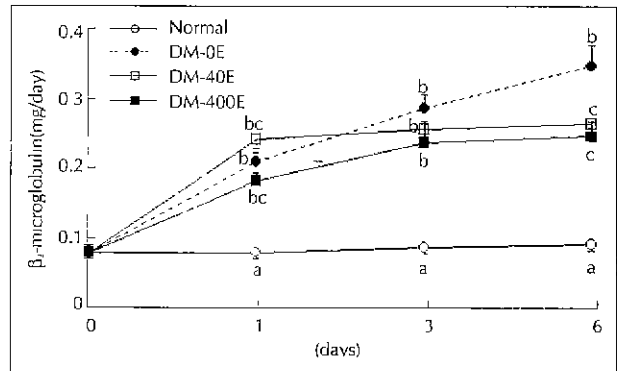


**Fig. 2.** Effects of vitamin E supplement on superoxide radical content in kidney of STZ-induced diabetic rats. Mean  $\pm$  SE. Bars with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's-HSD test. Other experimental conditions were same as described Fig. 1.

신장 microsome에서의 superoxide radical 함량은 정상군이 11.44(nmol/mg protein/min)인데 비해 DM-OE, DM-40E 및 DM-400E 군에서는 23.60(nmol/mg protein/min), 25.04(nmol/mg protein/min)와 12.02(nmol/mg protein/min)로 각각 정상군에 비해 2.1, 2.2, 1.1배씩 높았다. 그리고 비타민 E를 다량 공급한 DM-400E군은 DM-OE군에 비해 49% 감소되었다. Mitochondria 분획과 cytosol 분획에서도 그 함량의 차이는 있었으나 경향은 비슷하였다(Fig. 2).



**Fig. 3.** Effects of vitamin E supplement on urinary microalbumin contents of STZ-induced diabetic rats. Mean  $\pm$  SE. Bars with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's-HSD test. NS: Not significant. Other experimental conditions were same as described Fig. 1.



**Fig. 4.** Effects of vitamin E supplement on  $\beta_2$ -microglobulin levels in 24hrs urine of STZ-induced diabetic rats. Mean  $\pm$  SE. Bars with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's-HSD test. NS: Not significant. Other experimental conditions were same as described Fig. 1.

### 3. 뇨중 Microalbumin 함량

신장 사구체의 손상을 관찰하기 위해 뇨중 microalbumin 함량을 기간별로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

당뇨 유발 1일째는 유의적인 차이가 없었으나 3일째부터 급격히 증가하여 6일째에는 정상군에 비해 DM-OE군은 5배나 증가되었고 DM-40E군 및 DM-400E군은 각각 4.3배, 3.5배씩 증가되어 비타민 E 급여 수준의 증가에 따라 감소되었다. 따라서 비타민 E의 부족시 사구체 손상이 더 심하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3).

### 4. 뇨중 $\beta_2$ -microglobulin 함량

세뇨관 유래 단백질인  $\beta_2$ -microglobulin은 사구체 기저막을 용이하게 통과하여 세뇨관에서 거의 재흡수 된다. 그러므로 뇨중의  $\beta_2$ -microglobulin은 신세뇨관 손상을 초기에

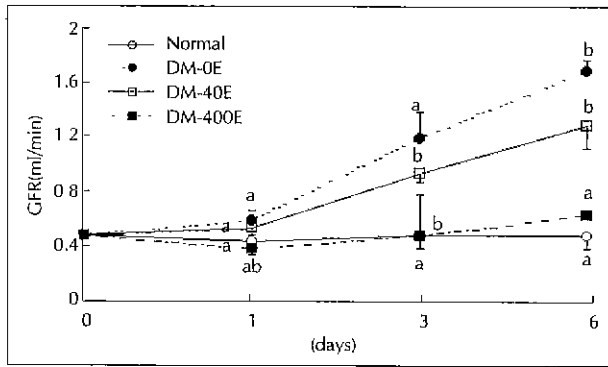


Fig. 5. Effects of vitamin E supplementation on renal GFR of STZ-induced diabetic rats. Mean  $\pm$  SE. Different letter on the top of the line indicates significant difference between groups by Tukey's-HSD test  $p < 0.05$ . Other experimental conditions were same as described Fig. 1.

알 수 있는 지표가 된다.

당뇨유발 후 24시간 뇨중  $\beta_2$ -microglobulin를 실험 기간 별로 관찰한 결과 Fig. 4와 같다. 정상군에 비해 당뇨군 모두에서 당뇨유발 후 1일째부터 유의적인 증가가 있었고, 기간이 경과할수록 DM-0E군의 증가폭이 큰 경향이 있으며 6일째에는 DM-0E군, DM-40E군 및 DM-400E군의 증가 수준은 정상군의 각각 268%, 181%, 및 163% 이었다. 이러한 경향은 뇨중 microalbumin 함량과 비슷한 경향으로 나타났다(Fig. 4).

### 5. 사구체 여과율(GFR)

사구체 여과율(GFR)의 변화는 신장의 대사 기능을 알아 보는데 기준이 된다. 당뇨유발 후 6일간 사구체 여과율을 측정 결과는 Fig. 5와 같다.

당뇨군에서는 정상군에 비해 당뇨유발 1일째는 큰 차이가 없었으나 3일째부터는 DM-0E군과 DM-40E군에서 증가하기 시작하여 6일째에는 GFR이 급격하게 상승되었다. 그러나 DM-400E군에서는 실험 6일째까지 정상군과 차이가 없었는데 이는 신장의 기능적 손상 예방에 비타민 E의 영향이 현저함을 알 수 있었다(Fig. 5)

## 고 찰

당뇨병에서는 자유 라디칼 제거계가 저하되거나 혹은 자유 라디칼 생성계가 활성화된다고 보고되고 있다.<sup>4)</sup> 생체내 유리기 생성계의 하나인 XOD는 purine, pyrimidine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체 내에는 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 요산을 생성하는 반응의 촉매로 작용한다.<sup>19)</sup> 또

한 이 효소는 virus 등의 감염 및 xenobiotics의 중독에 의한 간 손상시에 그 활성이 증가하며 이때 superoxide radical을 생성한다.<sup>20)</sup>

본 연구에서 STZ유발 당뇨쥐 신장에서 XOD의 활성 변화를 관찰한 결과 정상군에 비해 DM-0E군이 133% 증가하였으나 비타민 E를 다량 투여한 DM-400E군은 DM-0E군에 비해 25.4% 감소되었다. 이러한 결과는 STZ유발 당뇨쥐에서는 xanthine의 산화가 증가되어 XOD 활성이 증가한다는 Urano 등의 보고<sup>21)</sup>와 일치한다. 또 당뇨쥐 간장 조직에서 XOD 활성이 증가되었으나 항산화 기능이 있는 녹차 catechin을 투여했을 때 그 활성이 감소되었다는 박 등<sup>8)</sup>의 결과와 유사하다. 산화적 스트레스에 의한 혈관을 비롯한 여러 조직의 손상은 독성이 강한 자유 라디칼에 의한 반응의 결과이다. 자유 라디칼은 1개 또는 2개 이상의 부대전자(不對電子)를 가지며 독립해서 하나의 화학종으로서 존재할 수 있는 것을 가리킨다. Superoxide radical( $O_2^-$ ), hydroxyl radical( $OH\cdot$ ) 및 singlet oxygen( $^1O_2$ )등과 같은 자유 라디칼은 세포에 상해를 주며 특히 세포막의 다불포화 지방산에 작용하여 지질 과산화물을 생성하고 이로 인해 세포의 기능을 손상 시키므로써 조직의 노화와 여러 질병의 발병과 관련이 있다.<sup>22)</sup>

본 실험에서 자유 라디칼 중 대표적인 superoxide radical( $O_2^-$ ) 생성을 측정된 결과 대조군에 비해 당뇨 유발군 모두에서 증가한 것으로 나타났으며, 이것은 당뇨병 상태의 경우 활성산소 생성이 현저하게 증가한다는 여러 보고와 일치하였다.<sup>19,23)</sup> 또 이러한 현상은 비타민 E를 공급하지 않은 DM-0E군에서 더욱 가속화되었다. 결과적으로 vitamin E의 공급수준이 증가함에 따라 자유 라디칼 제거계의 활성이 증가되고 XOD와 같은 자유 라디칼 생성계의 활성이 감소됨에 기인한다고 볼 수 있다

따라서 본 연구에서와 같이 STZ 유발 당뇨쥐 신장에서 XOD 활성이 증가됨으로써 superoxide radical 생성에 기여하는 것으로 생각되며 비타민 E를 첨가하지 않은 DM-0E군에서 그 활성이 증가된 것으로 보아 XOD의 활성 증가가 산화적 손상요인 중의 하나로 작용했으며 항산화제인 비타민 E의 다량 투여는 XOD 활성을 저해하고 superoxide radical 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다

당뇨병성 신병증은 말기 신부전의 주된 원인중의 하나이며 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 미세 단백뇨(urine microalbumin)는 당뇨병성 신병증의 초기 지표로 알려져 있다.<sup>24)</sup> 인슐린 비의존형 당뇨병 환자에서 미세 단백뇨는 다소 복합적인 의미를 나타내는데 이는 당뇨병성 신병증의 지표일 뿐만 아니라<sup>24)</sup> 심혈관 질환의 이환률 및 사망률 증가

를 예측하는 독립적인 지표로도 알려져 있다<sup>31</sup> 이와 같은 사실은 미세 단백뇨의 원인이 다양하다는 것을 시사한다. Decker 등<sup>32</sup>에 의하면 당뇨병에서 미세 알부민뇨의 존재는 그 병태 생리학적 기전에 대해선 정확하게 규명되어 있지 못한 상태이지만 미세 알부민뇨가 신사구체를 포함한 전체 혈관의 과투과성과 같은 기능장애를 반영한다는 주장이다. 또한 단백뇨는 혈관 손상이 증가되는 지표로도 여겨지는데 이는 환자가 신장의 혈관질환으로 진전하는 경향에 기초를 둔다<sup>33</sup>

본 실험에서 신사구체의 손상을 관찰하기 위해 뇨중 microalbumin 농도를 관찰한 결과 당뇨 유발 1일째는 큰 차이가 없었으나 3일째부터 급격히 증가하여 6일째에는 정상군에 비해 비타민 E를 결핍시킨 DM-0E군에서는 그 증가율이 5배로 증가되었으나 비타민 E 공급수준 증가에 따라 낮아졌다. 따라서 비타민 E 부족시에는 사구체 손상이 심하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

세뇨관 단백질인  $\beta_2$ -microglobulin은 당뇨병성 신병증의 초기에 사구체 병변 뿐만 아니라 세뇨관 이상이 있을 때에도 발생한다고 보고되어 당뇨병성 신병증의 조기진단에 이용되고 있다.<sup>34</sup> 특히 사구체를 통과하여 99.9%가 근위세뇨관 세포에 의해 재흡수 되므로 뇨중 농도 측정이 근위세뇨관 질환의 진단에 매우 민감한 것으로 증명되어 당뇨병성 신병증의 조기 진단에 이용되고 있다<sup>35</sup> 본 연구에서, 당뇨쥐들이 정상쥐에 비해 뇨중  $\beta_2$ -microglobulin 농도가 유의적으로 증가되었고 특히 DM-0E군은 268%나 증가되었으며 DM-40E군은 181%, DM-400E군은 163%씩 각각 증가하였다. 따라서 이들 지표는 비타민 E 공급 수준 증가에 의해 유의적으로 감소함을 알 수 있었다 또한 실험 기간별로 관찰한 결과 시간이 경과할수록 증가폭이 큰 경향이 있었으며 6일째의 경우, DM-0E군에 비해 DM-40E, DM-400E군은 유의하게 감소하였다.

신장기능이 불량한 당뇨병의 초기 상태에서는 일반적으로 사구체 여과율이 증가하는데 본 연구에서도 사구체 여과율이 당뇨군 중에서 DM-0E, DM-40E군에서 유의적으로 증가가 되었으나 DM-400E군은 대조군 수준이었으며 이는 비타민 E가 당뇨병 신장질환의 가능성적 손상 예방에 크게 작용함을 알 수 있었다.

Meyers<sup>36</sup>와 Stephens<sup>37</sup> 보고에서 당뇨쥐에 비타민 E가 풍부한 식이를 16주 이상 공급하여 사육하였을 때 당뇨쥐에서 나타나는 비정상적인 혈압상승, 체중감소, 식이섭취 또는 사망률 증가가 관찰되지 않았다고 보고하였고, Dai-suke 등<sup>38</sup>은 9~10IU/day의 비타민 E에 1.3IU/day를 더 첨가한 식이를 급여할 경우 당뇨쥐에서 생존률 뿐만 아니라

신사구체의 병리학적인 변화를 막을 수 있다고 보고함으로써 비타민 E의 신기능 개선작용을 규명하였다. 본 연구에서도 비타민 E를 400mg/kg diet로 공급한 군에서는 비타민 E를 공급하지 않은 군에 비하여 신장의 손상을 막을 수 있음을 알 수 있었다.

본 연구결과 당뇨쥐 신장에서는 XOD 활성에 따른 superoxide radical과 같은 활성 산소종 생성이 증가되고 뇨중  $\beta_2$ -microglobulin과 microalbumin 농도가 증가하여 신장조직의 구조적 손상과 사구체 여과율을 비롯한 신기능 장애가 관찰되었다. 그러나 식이 비타민 E 공급으로 이들의 변화가 현저하게 개선되는 것으로 나타났다

이와같이 식이내에 항산화제인 비타민 E의 적절한 공급은 당뇨쥐 신사구체와 근위세뇨관의 산화적 손상에 의한 초기 생리적 기능 장애를 억제하는데 기여함이 증명되었다. 따라서 앞으로 이러한 항산화제의 적절한 이용으로 당뇨병 신기능장애 예방에 응용할 수 있도록 더 심도있는 연구가 필요하겠다.

## 요약 및 결론

본 연구는 당뇨쥐의 신장에서의 산화적 손상과 신장기능에 미치는 비타민 E의 영향을 규명하기 위해 수행되었다

실험동물은 100 ± 10gm 내외의 Sprague-Dawley 중수컷을 정상군과 당뇨군으로 나누었다. 당뇨군은 다시 식이내 비타민 E의 함량에 따라 0mg vitamin E/kg diet(DM-0E군), 40mg vitamin E/kg diet(DM-40E군), 400mg vitamin E/kg diet(DM-400E군)으로 달리하여 4주간 사육한 후 streptozotocin(STZ)으로 당뇨를 유발한 후 6일째에 희생시켰다

1) 신장 조직중의 XOD 활성은 정상군에 비해 DM-0E군, DM-40E군 및 DM-400E군에서 각각 133%, 110% 및 74%씩 증가되었다. 또 DM-400E군은 DM-0E군에 비해 25.4% 감소되었다

2) 신장조직의 microsome 중의 superoxide radical( $O_2^-$ ) 생성량은 정상군에 비해 DM-0E군, DM-40E군에서 각각 106%, 119%씩 각각 증가되었으나 DM-400E군은 거의 정상군 수준 가까이로 감소하는 경향이였다. Mitochondria 및 cytosol 분획에서도 함량의 차이는 있으나 비슷한 경향이였다

3) 근위세뇨관의 손상 지표인 뇨중 microalbumin 함량은 3일째부터 급격히 증가하여 6일째 정상군에 비해 DM-0E군에서 5배 증가되었고, DM-40E군과 DM-400E군에서는 DM-0E군보다 16%, 36%씩 각각 감소되었다. 또 사

구체 손상 지표인  $\beta_2$ -microglobulin 측정 결과는 6일째 정상군에 비해 DM-0E군, DM-40E군 및 DM-400E군에서 268%, 181% 및 163%씩 각각 증가되었다

4) 신장의 기능적 손상인 사구체 여과율은 정상군에 비해 DM-0E군과 DM-40E군은 당뇨 유발 3일째부터 유의적으로 증가되었으나 비타민 E 다량 공급군(DM-400E군)은 정상군과 비슷한 수준이었다.

결론적으로 식이내 비타민 E의 적절한 공급은 당뇨쥐 신사구체와 근위세뇨관의 산화적 손상과 생리기능장애를 감소시킬 수 있다.

■ 감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 연구비(1997-002-D00327)의 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. *JAMA* 241. 2035-2038, 1979
- 2) Garcia MJ, Mcnamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity in mortality in diabetes in the framingham population *Diabetes* 23 103-107, 1974
- 3) Patoa RC, Passa P. Platelets and diabetic vascular disease. *Diabetes Metab* 9 302-309, 1983
- 4) Baynes JW. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes *Diabetes* 40. 405-421, 1991
- 5) Hammers HD, et al. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Nat Acad Sci USA* 88 11555-11558, 1991
- 6) Mccord JM, Fridorich I. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocuprein(hemocuprein). *J Biol Chem* 244. 6049-6055, 1969
- 7) Kwag OG, Yang JA, Rhee SJ. Effects of vitamin E on the antioxidative defense system of kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Koren Soc Food Sci Nutr* 28(3) 654-662, 1997
- 8) Park GY, Lee SJ, Im IG. Effects of green tea catechin on cytochrome P<sub>450</sub>, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Koren Soc Food Sci Nutr* 26(5) 901-907, 1997
- 9) Park YR, Rhee SJ, Lim YS, Joo GJ. Effect of dietary vitamin E on the microsomal mixed function oxidase system of liver and lung in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Koren Soc Food Sci Nutr* 25(6) 969-975, 1996
- 10) Chai YM, Park MR, Rhee SJ. Effects of green tea catechin on the antioxidative defense system and lipofuscin levels of heart in streptozotocin-induced diabetic rats *Kor J Gerontol* 8(3) 96-103, 1998
- 11) Krolewski U, Fridonch I, Grundy SM, Williams G. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin dependent diabetes mellitus *N Engl J Med* 332 1251-1255, 1995
- 12) Rhee SJ, Choe WK, Ha TY. The Effect of vitamin E on the antioxidative defense mechanism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Japanese Soc Nutr and Food Sci* 48(6) 451-457, 1995
- 13) Rhee SJ, Shin JY, Cha BG. Effects of green tea catechin on the microsomal mixed function oxidase system of kidney and brain in streptozotocin-induced diabetic rats *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(2). 319-325, 1998
- 14) Stripe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244(14). 3855-3863, 1969
- 15) Haper MJK, Haper C, Norris J, Friedrichs WE, Moreno A, Poly IC. Accelerates ovum transport in the rabbit by a prostaglandin-mediated mechnism. *J Report Fert* 63 81-89, 1981
- 16) Azzı A, Montecucco C, Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membrane *Biochem and Biophys Res* 65(2) 597-603, 1975
- 17) Lowry OH, Rosenbrouth NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 265-275, 1951
- 18) Chai SE, Kim BR. Statstic analysis used spss/pc. Bummum Co., 1988
- 19) Duke E, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *J Biochem* 131 187, 1973
- 20) Ziegler DW, Hutchuson HD, Kissing RE. Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice *Infection and Immu* 3: 237, 1971
- 21) Urano S, Midori H, Tochihi N, Matsuo M, Shuraki M, Ito H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposome to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26(1) 58-61, 1991
- 22) Bruce AF, James D, Carpo MD. Biology of disease Free radicals and Tissue Injury *Lab Invest* 47. 412-426, 1982
- 23) Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Radic Biol Med* 10. 339-352, 1991
- 24) Parvng HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Christiansen JS, Andersen AR. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. *Acta Endocrinol* 100 550-555, 1982
- 25) Nelson RG, Knower WC, Pattitt DJ, Saad MF, Charles MA, Bennett PH. Assessment of risk of overt nephropathy in diabetic patients from albumin excretion in untimed urine specimens. *Arch Intern Med* 176(1)-1765, 1991
- 26) Deckert T, Feidt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jesen T, Kotord Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage:the steno hypothesis *Diabetologia* 32 219-226, 1989
- 27) Peter R, Kasper R, Peter J, Hans HP. Unchanged incidence of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes* 44 739-743, 1995
- 28) Bernard AM, Moreau D, Lauways R. Comparison of retinol-binding protein and  $\beta_2$ -microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clin Chim Acta* 126 1-8, 1982
- 29) Schardijn, GHC, LWSV.  $\beta_2$ -microglobulin, its significance in the evaluation of renal function, kidney. *Int* 32 632-637, 1987
- 30) Meyers DG, Maloley PA, Weeks D. Safety of antioxidant vitamins *Arch Intern Med* 156 925-935, 1996
- 31) Stepiens NG, Person A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mit-chinson MJ. Randomised trial of vitamin E in patients with coronary disease Cambridge heart antioxidant study(CHAOS). *Lancet* 347 781-786, 1996
- 32) Daisuke Y, In-Kvu L, Hidehiro L, Hideo K, George LK. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d- $\alpha$ -tocopherol. *J. Am Soc Nephrol* 8 426-435, 1997