

당뇨병 흰쥐에서 식이 제한 급여가 장기의 항산화효소 활성도 및 체중에 미치는 영향

이병래 · 차종희 · 박제운 · 박영진* · 박평심**†

조선대학교 의과대학 생화학교실

*임상병리학교실

**동강대학 식품영양과

Effects of Dietary Restriction on the Body Weight and Antioxidant Enzymes in Various Organs of Diabetic Rats

Byoung-Rai Lee, Jong-Hee Cha, Jae-Yoon Park, Young-Jin Park* and Pyoung-Sim Park**†

Dept. of Biochemistry and *Clinical pathology.

College of Medicine, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Dongkang College, Kwangju 500-714, Korea

Abstract

The effects of dietary restriction (DR) on antioxidant enzymes were studied in liver, lung and erythrocytes of diabetic rats. Experimental animals used Sprague-Dawley (SD; body weight 350 ± 20 g) male rats and Otsuka Long Evans Tokushima fatty (OLETF; body weight 500 ± 30 g) male rats, as a model of type 2 diabetes mellitus. Type 1 diabetes was induced in SD rats by intramuscular injection of alloxan (80 mg/kg BW). Animals were randomly assigned either to continue the ad libitum diet or 40% DR (60% intake of ad libitum diet) groups. The body weight was measured at every 2 weeks to 4 months following DR. The activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSHPx)) were measured in liver, lung and erythrocytes and the concentration of TBARS as a marker of reactive oxygen species-induced tissue injury was also measured in rats after 4 months 40% DR. The body weight 4 months after 40% DR of control SD, alloxan-diabetic SD and OLETF rats were 80%, 98% and 75% of each control groups, respectively. The activities of SOD, catalase and GSHPx in lung and erythrocytes of rats were not change by 40% DR but in 4 month 40% DR rat liver, the activities of SOD and catalase were increased in control SD, alloxan-diabetic SD, and OLETF groups. The concentration of TBARS in lung and erythrocytes was also not changed by 40% DR, while liver TBARS concentration was decreased in OLETF and control SD rats compared to each non-DR control rats. These results suggested that the body weight changes in diabetic rats by DR was more prominent in type 2 diabetes and changes of antioxidant enzymes is most prominent in liver by DR either type 1 and type 2 diabetic rats.

Key words: dietary restriction, diabetes, antioxidant enzyme

서 론

노화를 예방하고 수명을 연장시키는 것은 전 인류의 소망으로 이에 대한 많은 노력이 있었으나 현재까지 획기적인 방법이 제시되고 있지는 않다. 최근 식이 제한이 노화를 지연시킬 수 있는 방법으로 많은 관심의 대상이 되고 있는데, 영양학적으로 불균형을 초래하지 않을 정도의 식이 제한은 당뇨병의 치료에서 혈당을 조절하는 대단히 중요한 방법으로서 인슐린 의존형 당뇨병이나 인슐린 비 의존형 당뇨병의 치료에 이용된다(1-4).

호기성 세포의 산소 대사 과정에서 생성되는 유리산소는 노화에 밀접한 연관이 있으며 계속적으로 서서히 진행되는

항산화 방어계의 약화는 산화적 세포손상을 초래하여 세포 노화에 중요한 요인으로 작용하고(5-7), 암이나 동맥경화증과 같은 다른 퇴행성질환의 발생이나 당뇨병과도 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 최근 의학 및 생물학 분야에서 관심의 대상이다(8)

당뇨병은 국민 건강을 저해하는 사회적으로 관심이 높은 질환으로 우리나라 인구의 5~8% 정도를 차지할 정도로 유병율이 대단히 높으며, 고혈압, 동맥경화증 등 혈관합병증이 나, 당뇨병성 망막병증, 신경병증 및 신증 등 이차 합병증을 초래하는데, 이러한 합병증은 세포의 산화적 손상과 연관이 있으며, 포도당의 자가산화나, 미토콘드리아로부터 생성되는 산소 유리기가 산화적 세포손상의 주요한 요인으로 거론되

†Corresponding author. E-mail: brlee@mail.chosun.ac.kr
Phone 82-62-220-3669, Fax 82-62-226-4165

고 있다(9,10).

실험적인 당뇨병 유발은 streptozotocin이나, alloxan과 같이 췌도 베타세포를 파괴하여 인슐린 의존형 당뇨병을 유발하는 제제를 이용하는 방법(11)과 유전적으로 당뇨병을 유발하는 실험모델 동물을 이용하는 방법이 있다. 유전적으로 당뇨병을 유발하는 실험모델 동물로는 인슐린 의존형 당뇨병은 non-obese diabetic(NOD) 생쥐와 BioBreeding(BB) 흰쥐가 있고, 인슐린 비 의존형 당뇨병은 Goto-Kakizaki(GK) 흰쥐와 OLETF 흰쥐가 알려져 있다(12-15)

Streptozotocin 유발성 당뇨쥐에서 적혈구 glutathione peroxidase(GSHPx) 활성도가 증가되고, 신장 및 적혈구에서 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 감소되며, 췌장 catalase와 SOD 활성이 유의하게 증가되었고, 인슐린 비 의존형 당뇨병 환자의 적혈구 SOD 활성도는 감소하였으며, 인슐린 의존성 당뇨병환자에서 적혈구 SOD 및 GSHPx 활성이 감소하여(16-18), 당뇨병에서 세포 항산화제의 변화가 초래됨을 알 수 있다.

당뇨병 환자의 치료에서 혈당을 낮추고 체중을 감소시킬 목적으로 열량소 섭취량을 저하시키는 식이 제한 방법이 이용되는데, Ohneda 등(19)은 사람의 인슐린 비 의존형 당뇨병과 유사한 병변을 나타내는 Zucker diabetic fatty rats에서 식이 제한이 인슐린을 합성, 분비하는 베타세포 기능의 저하를 예방하는 작용이 있는 것으로 보고하였고, Ramesh(20)는 항산화물질인 비타민 C, E를 투여하면 베타세포의 손상을 예방한다고 하여, 베타세포의 손상방지에 식이 제한과 항산화물질이 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 실험동물에서 식이 제한 급여에 의한 여러 장기에서 항산화효소 활성에 변화를 유발하는 것으로 알려져 있는데, 당뇨병에서 식이 제한 급여에 의한 항산화효소 활성도 변화에 대한 보고는 아직 없다.

따라서 본 실험에서는 당뇨병에서 식이 제한에 의한 각 장기의 항산화제 변화 관찰의 일환으로 식이 제한 급여에 의한 산화적 세포손상과 항산화효소 활성도 변화를 Sprague-Dawley(SD) 종 흰쥐에 alloxan(80 mg/kg im)을 주사하여 당뇨병을 유발한 alloxan 당뇨 흰쥐와 당뇨병이 자연적으로 유발되는 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF)종 당뇨 흰쥐를 이용하여 식이 급여량을 40% 제한시켜 4개월간 사육한 후 간장, 폐 및 적혈구 항산화효소 활성도와 지질과산화산물인 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 양을 측정하여 식이 제한 급여에 의한 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육

실험동물은 Sprague-Dawley(SD)종 흰쥐(체중 350±20 g, 수컷)와 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF)종 흰쥐(체중 500±30 g, 수컷)를 사용하였다. 당뇨병 유발은 SD 종 흰쥐에 alloxan(80 mg/kg BW)를 근육주사하여 1주일 후 혈당량이 250 mg/dL 이상인 쥐를 alloxan 당뇨군으로, OLETF 종 당뇨군은 혈당량이 150 mg/dL 이상인 쥐를 실험

에 이용하였다. 실험은 SD 종 정상 식이량 급여군(흰쥐 한 마리에 사료를 1일 20 g씩 공급)과 식이 급여량 40% 제한군(흰쥐 한 마리에 사료를 1일 12 g씩 공급)으로 나누어 사육하면서 시간 경과에 따라서 2주일 간격으로 체중을 측정하고, 4개월 후 각각 흰쥐를 7마리씩 희생시켜 장기를 적출하여 실험에 사용하였다. 또한 alloxan 당뇨군과 OLETF 종 당뇨군을 SD 종 정상 식이량 급여군(25 g/rat/day)과 식이 급여량 40% 제한군(15 g/rat/day)으로 나누어 사육하고 4개월 후 희생시켜 장기를 적출하여 실험에 사용하였다.

시료의 조제

흰쥐는 ether 마취후 복부대동맥에서 헤파린으로 처리한 주사기로 혈액을 채취하고 간장과 폐를 적출하였다. 채취된 혈액은 4°C에서 500×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 중성지질, 혈당 및 cholesterol량의 측정에 이용하였고, 침전된 하층은 buffy coat를 제거한 후 0.9% 생리식염수로 3회 세척하여 일부를 적혈구 TBARS량 측정 시료로 사용하였다 나머지 시료중 0.1 mL를 취해서 증류수 1.9 mL를 첨가하여 용혈시키고 4°C에서 10,000×g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도 측정의 조효소액으로 사용하였다 또한 적출된 간장과 폐는 즉시 dry ice-ethanol 혼합액으로 냉동시켜서 -80°C에서 보관하였다. 조직 일부를 절제하여 20배 용량(w/v)의 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 가한 후 ice jacket 상태에서 polytron homogenizer로 12,000 rpm에서 15초씩 3회 반복하여 균질화시킨 균질액 일부는 TBARS량 측정 시료로 이용하고 나머지는 4°C에서 10,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도 측정의 조효소액으로 사용하였다.

Superoxide dismutase 활성도 측정

SOD 활성도는 Crapo 등(21)의 방법에 의해서 측정했다. 즉 시험관에 0.1 mM EDTA와 0.2 mM KCN를 함유한 100 mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.3 mL에 0.5 mM xanthine 0.3 mL와 0.1 mM cytochrome C 0.3 mL를 넣고 혼합한 후 25°C에서 3분동안 방치한 후 cuvette으로 옮겨 xanthine oxidase 용액을 가하여 UV-spectrophotometer(Gilford 2,000)로 550 nm에서 1분간 변화되는 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가 속도가 매분당 0.020이 되게 xanthine oxidase량을 조절하였다. 효소의 활성도는 상기 조건에서 조효소액 0.01 mL를 가하고 흡광도 변화를 측정하였으며, cytochrome C 환원속도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

Catalase 활성도 측정

Catalase 활성도는 Aebi(22)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.0 mL에 조효소액 0.05 mL를 가하여 혼합한 후 25°C에서 3분간 방치한 후 10 mM H₂O₂ 용액 1.0 mL를 가하여 혼합하고 즉시 240 nm에서 15초간 변화되는 흡광도를 측정했다. 효소의 활성도는 1분동안에 1 μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소량을 1 unit로 하였다

Glutathione peroxide 활성도 측정

GSHPx 활성도는 Flohe 등(23)의 방법으로 측정하였다. 즉 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 100 mM EDTA 0.03 mL, 100 mM GSH 0.03 mL 및 45/mL glutathione reductase 0.03 mL를 넣고 37°C에서 5분간 방치한 후 15 mM NADPH 0.03 mL와 45 mM H₂O₂를 최종 농도가 0.01 mM이 되게 가한 후 조효소 용액 10 µL를 가하여 340 nm에서 3분동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 효소액을 가하지 않고 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하였고, 효소활성도는 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 감한 값을 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$A = 0.868 \frac{[NADPH]_t}{[GSH]_0} (V_i/V_s)$$

여기서 A : 효소 활성도, [NADPH]_t : NDAPH 농도변화, [GSH]₀ : GSH의 처음농도, t : 반응시간, V_i : 반응액의 용량 및 V_s : 효소액의 용량이다.

TBARS량 측정

TBARS량은 Buege와 Aust(24)의 방법에 의해서 측정하였다. 즉 0.375%(w/v) TBA 용액 1.0 mL에 BHT를 최종농도가 0.01%가 되게 가하고 균질액 1.0 mL를 가하여 잘 혼합한 후 98°C로 15분간 가열한다. 가열 후 즉시 냉각시켜 1,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 취해 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS량은 malondialdehyde의 흡광계수를 156×10²/mM/Cm로 간주하여 계산하였다.

단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(25)에 의해서 측정하였다. 즉 시험관에 증류수 0.45 mL와 20배로 희석한 시료액 0.05 mL 및 용액 A(2%(w/v) Na₂CO₃ in 0.1 M NaOH), B(1%(w/v) CuSO₄ 수용액), C(2%(w/v) Na-K tartrate 수용액) 혼합액 (A : B : C = 98 : 1 : 1) 2.5 mL를 가하고 혼합시켜 상온에 방치한다. 10분 후 phenol reagent 0.1 mL를 가하여 혼합하고, 20분 후에 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 단백 시료를 같은 방법으로 측정하여 단백질량을 계산하였다.

혈당측정

혈당의 측정은 hexokinase(HK)와 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)를 이용하여 생화학 자동분석기(Hitachi 717, Japan)를 이용하여 측정하였다.

실험결과의 유의성 판정

이상의 실험결과는 Student's t-test에 의해서 검정하였고, p-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

식이 제한 급여에 의한 체중 변화

체중은 에너지 섭취량과 에너지 소모량의 균형에 의해서

유지되는데 에너지 섭취량이 소모량보다 더 많으면 체중이 증가되고 소모량이 더 많으면 체중은 감소된다. 따라서 식이 제한은 체중에 직접적인 영향을 미칠 수 있는데, 본 실험에서 체중 350±20 g인 SD 종 정상 식이량 급여군 흰쥐를 사육하면서 2주일 간격으로 4개월까지 체중을 측정된 결과 2주에 약 9 g 정도씩 체중이 증가되어 4개월 후 체중은 428±22 g으로 약 22%의 체중 증가를 나타냈고, 식이 급여량을 40% 제한시킨 군은 350±20 g이던 체중이 4개월 후 346±23 g을 나타내서 시간경과에 따른 체중의 변화가 거의 나타나지 않아서 식이 제한 급여 군에서 4개월 후 체중이 현저히 낮음을 알 수 있다(Fig. 1).

식이 제한 급여는 비만형 당뇨병에서 체중을 감소시킬 수 있으며, 당뇨병 환자에서 체중감소는 인슐린에 대한 반응성을 증가시키는 등 당뇨병의 치료에 긍정적인 영향을 나타내는 것으로 알려져 있다(4,20). 따라서 식이 제한 급여가 당뇨 흰쥐의 체중에 미치는 영향을 알아보기 위해 체중 300±23 g인 SD 종 alloxan 당뇨군을 사육하면서 체중을 측정된 결과 정상 식이량 급여군은 4개월 후 체중이 268±21 g으로 실험 시작 때의 체중에 비하여 약 11%가 감소되었으며, 식이 급여량 40% 제한군에서는 4개월 후에 체중이 약 12% 감소되어 alloxan 당뇨군에서 식이 급여량 40% 제한이 체중변화에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 나타났다.

또한 체중 500±30 g인 OLETF 종 당뇨군을 정상 식이 급여로 4개월 사육한 결과 체중이 20%가 증가되었으나, 식이 급여량 40% 제한군의 4개월 후 체중은 476±22 g을 나타내서 체중이 약간 감소되어 alloxan 당뇨군에서 체중이 모두 감소되었던 결과와는 다른 유형을 나타내고 있다. 인슐린 의존형 당뇨병인 alloxan 당뇨병에서 당뇨병의 발생 이후 체중이 서서히 감소되었으나 인슐린 비 의존형인 OLETF 종의 경우는

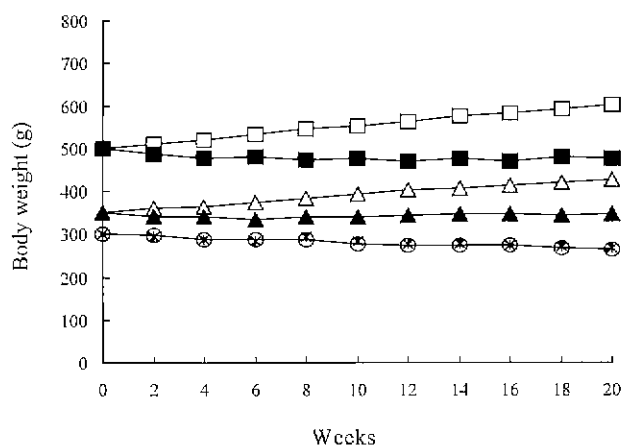


Fig. 1. Effects of caloric restriction on the body weight of rats.

Values are mean±SD, n=7. OLETF : Otuka Long Evans Tokushima fatty, SD : Sprague-Dawley, DM : Diabetes mellitus, CR : Caloric restriction. □ OLETF Control, ■ OLETF CR, △ SD Control, ▲ SD CR, ⊖ Alloxan-DM control, ⊖ Alloxan-DM CR.

당뇨병의 발생 이후에도 체중의 증가가 계속되었다. 그러나 식이 제한 급여의 경우 인슐린 의존형이나 인슐린 비 의존형에서 모두 약간의 체중 감소를 나타내서 당뇨 흰쥐에서 식이 급여량 40% 제한이 체중의 변화에 미치는 영향이 적은 것으로 생각된다. Park 등(26)의 실험결과에 의하면 흰쥐를 100% 식이 제한 급여시키면 체중은 식이 제한 급여 시작 후 2일 경과 후부터 감소되기 시작하여 식이 제한 급여 7일째는 식이 제한 급여 시작 때의 체중에 비하여 27%가 감소된다고 하였으나, 식이 급여량을 40% 제한시킨 본 실험에서는 4개월 동안 사육한 흰쥐에서 체중의 변화는 크지 않았고, 특히 alloxan 당뇨군의 체중변화에 미치는 영향은 적은 것으로 나타났다. 그러나 비만형 당뇨병 환자에서 체중의 감소는 인슐린의 감수성을 증가시킬 수 있기 때문에 인슐린 비 의존형 당뇨병 흰쥐인 OLETF 중 당뇨군에서 식이 급여량 40% 제한은 체중의 증가를 막아 주기 때문에 체중 증가에 의한 인슐린의 반응성 감소를 방지할 수 있을 것으로 추측된다.

식이 제한 급여의 흰쥐 간, 폐 및 적혈구의 항산화효소 활성도에 미치는 영향

유리기에 의한 세포손상은 유리기의 생성량 증가나 소거량 감소에 의해서 초래될 수 있는데, 이는 항산화효소인 SOD, catalase 및 GSHPx의 활성도 변화에 의해서 일어날 수 있다(3-5). Rao 등(27)은 생후 21개월 및 28개월된 흰쥐에서 부분절식(40%)에 의해 간 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도가 증가되고, 특히 catalase가 가장 큰 효소활성도 증가를 나타냈다고 하였고, Xia 등(28)은 16개월 및 26개월된 흰쥐의 부분절식(40%)시킨 간 및 신장 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도는 모두 증가된다고 하여, 장기간의 부분절식에 의해서 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도가 모두 증가된다고 하였다. 그러나 Lammi-Keefe 등(29)은 생후 41일된 흰쥐를 2일간 완전절식시킨 후 항산화효소 활성도를 측정된 결과, 근육에서 catalase 활성도는 식이 제한 급여하지 않은 쥐에 비하여 2배 정도 증가되어 있었으나, SOD 활성도는 변화가 없었고, 심장에서는 catalase와 SOD 모두 효소 활성도 변화가 없다고 하여 식이 제한 급여에 의한 효소 활성도 변화는 실험동물의 연령, 식이 제한 급여정도, 식이 제한 급여기간 및 장기에 따라서 다를 것으로 생각된다.

본 실험결과 흰쥐의 간 SOD 활성도는 정상 식이량 급여군에 비하여 식이 급여량 40% 제한군에서 SD 중 정상군은 14.7%, alloxan 당뇨군은 31%, OLETF 중 당뇨군은 13%가 각각 증가되어 SD 중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 식이 제한 급여에 의해서 간 SOD 활성도가 증가됨을 보여 주고 있으며, alloxan 당뇨군에서 증가율이 가장 높게 나타났다(Table 1).

간 catalase 활성도는 정상 식이량 급여군에 비하여 식이 급여량 40% 제한군에서 SD 중 정상군에서 26.5%, alloxan 당뇨군에서 27.6%, OLETF 중 당뇨군에서 23.5%가 각각 증가되어 SD 중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군

Table 1. Effects of dietary restriction on the activities of superoxide dismutase in various organs of rats

Groups	Organs	Superoxide dismutase (U/mg protein)	
		Control diet	40% DR
SD Control	Liver	8.47±1.83 ¹⁾	9.72±1.23 ¹⁾
	Lung	3.13±0.42	3.23±0.42
	RBC	20.97±3.47	22.45±2.31
Alloxan DM	Liver	6.35±2.17	8.32±2.35 ¹⁾
	Lung	2.35±0.54	3.02±0.53
	RBC	16.35±3.21	18.21±4.23
OLETF	Liver	8.71±1.28	9.82±1.60 ¹⁾
	Lung	3.16±0.38	3.06±0.39
	RBC	16.51±2.24	17.90±3.02

¹⁾Values are mean±SD, n=7

*p<0.05 vs each control diet group.

DR: dietary restriction, SD: Sprague-Dawley, OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty, RBC: red blood cells.

에서 모두 식이 제한 급여에 의해서 간 catalase 활성도가 증가되었고, 식이 제한 급여에 의한 효소 활성도 증가율은 당뇨 쥐와 정상쥐에서 비슷하게 나타났다(Table 2)

간 GSHPx 활성도는 정상 식이량 급여군에 비하여 식이 급여량 40% 제한군에서 SD 중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 식이 제한 급여에 의한 효소활성도의 차이를 나타내지 않았다(Table 3).

SD중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 정상 식이량 급여군과 식이 급여량 40% 제한군 사이에 폐조직에서의 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도의 차이를 나타내지 않아서, 식이 제한 급여가 폐조직에서의 항산화효소에 미치는 영향은 적은 것으로 생각된다.

식이 급여량 40% 제한군의 적혈구 SOD와 catalase 활성도는 SD 중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 당뇨군에서 모두 정상 식이량 급여군과 효소활성도의 차이를 나타내지 않았고, 적혈구 GSHPx 활성도는 식이 제한 급여에 의해 SD

Table 2. Effects of dietary restriction on the activities of catalase in various organs of rats

Groups	Organs	Catalase (U/mg protein)	
		Control diet	40% DR
SD Control	Liver	24.12±2.45 ¹⁾	30.52±3.71 ¹⁾
	Lung	8.21±1.34	7.86±1.12
	RBC	12.27±3.41	12.23±4.23
Alloxan DM	Liver	20.63±3.21	26.33±4.23 ¹⁾
	Lung	7.62±0.87	8.25±1.56
	RBC	10.23±4.11	11.21±3.42
OLETF	Liver	30.31±4.72	37.45±3.46 ¹⁾
	Lung	7.66±1.10	8.24±1.22
	RBC	17.36±2.04	16.69±3.32

¹⁾Values are mean±SD, n=7.

*p<0.05 vs each control diet group.

DR: dietary restriction, SD: Sprague-Dawley, OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty, RBC: red blood cells

Table 3. Effects of dietary restriction on the activities of glutathione peroxidase in various organs of rats

Groups	Organs	Glutathione peroxidase (U/mg protein)	
		Control diet	40% DR
		SD Control	Liver Lung RBC
Alloxan DM	Liver Lung RBC	7.65±1.98 5.67±0.65 16.55±3.52	8.45±2.34 6.01±0.75 19.12±4.45
OLETF	Liver Lung RBC	9.17±1.52 5.53±0.63 17.36±1.57	10.98±1.76 5.73±0.34 20.35±3.32 ¹⁾

¹⁾Values are mean±SD, n=7

*p<0.05 vs each control diet group

DR: dietary restriction, SD Sprague-Dawley, OLETF Otsuka Long Evans Tokushima fatty, RBC: red blood cells

종 정상군에서 25.2%가 증가되었으나, alloxan 당뇨군에서는 효소 활성도 변화가 없었고, OLETF 종 당뇨군에서는 17.2%가 증가되었다(Table 3). 이러한 실험결과는 Lammi-Keefe 등(29)의 식이 제한 급여에 의한 항산화 효소의 활성도 변화가 장기의 종류나 효소의 종류에 따라서 차이가 있다는 실험결과와 유사한 소견이며, 적혈구와 폐 및 간 중에서 간의 항산화효소 활성도가 가장 큰 변화를 나타내서 식이 제한 급여가 간의 효소에 가장 큰 영향을 주는 것으로 생각된다. 또한 항산화효소 중에서는 catalase 활성도가 식이 제한 급여에 의해서 가장 큰 증가율을 나타냈고, 인슐린 의존형 당뇨쥐나 인슐린 비 의존형 당뇨쥐에도 유사한 효소 활성도 변화를 나타내서 식이 제한 급여에 의한 각 장기의 항산화 반응의 변화는 당뇨병 형태에는 영향이 적은 것으로 추측된다.

식이 제한 급여의 흰쥐 간, 폐 및 적혈구의 TBARS량에 미치는 영향

TBARS량은 유리기에 의한 지질손상의 지표로서 가장 많이 이용되는데, Xia 등(28)은 흰쥐를 26개월간 사육한 흰쥐 실험에서 장기 TBARS량은 시간이 경과됨에 따라서 증가된다고 하여 노화의 진행과 TBARS량 증가가 연관성이 있음을 보여주고 있으며, 40% 식이 제한 급여에 의해서 TBARS량은 현저히 감소된다고 하였고, Albrecht 등(30)은 4주간 식이 제한 급여시킨 흰쥐의 간에서 TBARS량이 약 40% 감소된다고 하였다.

본 실험에서 식이 제한 급여 흰쥐의 간 TBARS량은 식이 급여량 40% 제한군 SD 종 정상군에서 30%, OLETF 종 당뇨군에서는 26%가 각각 감소되었으나, alloxan 당뇨군에서는 TBARS량의 변화를 나타내지 않아, 식이 제한에 의한 간 TBARS량의 변화는 흰쥐의 종류나 상태에 따라서 서로 다른 양상을 나타내었다(Table 4).

폐 TBARS량은 SD 종 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF

Table 4. Effects of dietary restriction on the contents of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in lung and liver of rats

Groups	Organs	TBARS contents (nM/g tissue)	
		Control diet	40% DR
		SD Control	Liver Lung
Alloxan DM	Liver Lung	20.7±4.1 10.7±1.9	18.7±4.2 8.9±2.1
OLETF	Liver Lung	19.8±2.5 9.8±1.4	14.7±2.4 ¹⁾ 8.6±2.0

¹⁾Values are mean±SD, n=7.

*p<0.05 vs each control diet group.

DR: dietary restriction, SD: Sprague-Dawley, OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty, RBC: red blood cells.

Table 5. Effects of dietary restriction on the contents of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in RBC of rats

Groups	TBARS contents (nM/mL RBC)	
	Control diet	40% DR
	SD Control	31.4±5.1 ¹⁾
Alloxan DM	32.7±11.9	28.9±8.1
OLETF	35.8±9.4	30.6±9.2

¹⁾Values are mean±SD, n=7.

DR: dietary restriction, SD Sprague-Dawley, OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty, RBC: red blood cells

종 당뇨군에서 모두 정상 식이량 급여군과 차이를 나타내지 않았고, 적혈구 TBARS량은 SD 종 정상군, alloxan 당뇨군 및 OLETF 종 당뇨군에서 정상 식이량 급여군과 식이 급여량 40% 제한군 사이에 차이를 나타내지 않았다(Table 5). SD 종 정상군과 OLETF 종 당뇨군에서 식이 제한 급여에 의해서 간의 TBARS량이 감소된 것은 Albrecht 등(30)이 식이 제한시킨 흰쥐의 간에서 TBARS량이 감소된다는 보고와 유사한 소견으로, TBARS량 감소는 항산화 효소 특히 SOD와 catalase 활성도의 증가와 관련이 클 것으로 생각된다. 이상의 실험결과 식이 급여량 40% 제한에 의한 산화적 세포손상 산물인 TBARS량이 간에서 가장 큰 감소를 나타내므로 식이 제한 급여는 간의 산화적 손상에 가장 큰 예방 효과가 있는 것으로 생각되고, OLETF 종 당뇨군에서도 TBARS량의 감소가 정상 흰쥐와 같은 양상을 나타내므로 당뇨병 환자에서도 식이 제한 급여는 간의 산화적 손상을 예방할 수 있을 것으로 생각된다 반면에 alloxan 당뇨군에서는 간 TBARS량이 감소되지 않은 것은 항산화효소 활성도 이외의 다른 요인에 의한 결과로 추측되며 이에 대한 추적연구가 계속 되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 실험에서는 인슐린 의존형 당뇨병 모델로서 alloxan 당뇨 흰쥐를, 인슐린 비 의존형 당뇨병 모델로 알려진 OLETF

중 당뇨 흰쥐를 각각 이용하여 식이 제한 급여 당뇨 흰쥐의 체중과 간, 폐 및 적혈구의 항산화효소 활성도를 측정하여 식이 제한 급여가 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하였다. SD 중 정상군, alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군의 체중은 정상 식이량 급여군은 4개월 후 각각 22%증가, 11%감소 및 20%증가를 나타냈고, 식이 급여량을 40% 제한시킨 각군은 4개월 후 체중이 각각 1%증가, 12%감소 및 6%감소되어 SD 중 정상군과 OLETF 중 당뇨군에서는 식이 제한 급여군의 체중이 현저히 낮았으나, alloxan 당뇨군은 식이 제한 급여가 체중에 미치는 영향이 적었다. 식이 급여량을 40% 제한시켜 4개월간 사육한 흰쥐의 간 SOD 활성도는 SD 중 정상군은 14%, alloxan 당뇨군은 31%, OLETF 중 당뇨군은 13%가 각각 증가되었고, catalase 활성도는 SD 중 정상군, alloxan 당뇨군, OLETF 중 당뇨군에서 각각 26%, 27% 및 23%씩 증가되었고, GSHPx 활성도는 SD 중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 식이 제한에 의한 효소활성도의 차이가 없었다. 폐 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도는 SD중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 차이를 나타내지 않았다. 식이 급여량을 40% 제한시킨 흰쥐의 적혈구 SOD와 catalase 활성도는 SD중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 정상 식이량 급여군과 차이를 나타내지 않았고, GSHPx 활성도는 SD 중 정상군에서 25.2%가 증가되었으나, alloxan 당뇨군에서는 식이 제한 급여에 의한 효소 활성도 변화가 없었고, OLETF중 당뇨군에서는 식이 제한 급여로 적혈구 GSHPx 활성도는 17.2%가 증가되었으나, 간과 폐에서는 변화가 없었다. 식이 급여량을 40% 제한시킨 흰쥐의 간 TBARS량은 SD중 정상군에서 30%, OLETF중 당뇨군에서 26%가 각각 감소되었으나, alloxan 당뇨군에서는 변화가 없었고, 폐 TBARS량은 SD중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF중 당뇨군에서 모두 정상 식이량 급여군과 차이를 나타내지 않았다. 적혈구 TBARS 량은 SD 중 정상군과 alloxan 당뇨군 및 OLETF 중 당뇨군에서 모두 정상 식이량 급여군과 차이를 나타내지 않았다. 이러한 실험결과로 당뇨쥐에서 식이 제한 급여에 의한 체중의 변화는 인슐린 의존형 당뇨병보다 인슐린 비 의존형 당뇨병에서 더 큰 것으로 나타났다. 당뇨쥐에서 식이 제한 급여에 의한 항산화효소의 활성도 변화는 장기의 종류나 효소의 종류에 따라서 차이가 있음을 알 수 있는데, 항산화효소 활성도 변화가 간에서 가장 크게 나타났고, TBARS량의 감소도 간에서 나타나므로, 식이 제한 급여는 간의 항산화계에 영향이 큰 것으로 생각되고, 식이 제한 급여에 의한 항산화계의 변화는 당뇨병의 형태와는 관련이 적은 것으로 추측된다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 조선대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

- Masoro, E.J. Nutrition and aging. *J. Nutr.*, **115**, 842-848 (1985)
- Heydari, A.R. and Richardson, A. Does gene expression play any role in the mechanism of the anti aging effect of dietary restriction? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **21**, 384-395 (1992)
- Capstick, F., Brooks, B.A., Burns, C.M., Zilkens, R.R., Steinbeck, K.S. and Yue, D.K. Very low calorie diet (VLCD) a useful alternative in the treatment of the obese NIDDM patient. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **36**, 105-111 (1997)
- Williams, K.V., Mullen, M.L., Kelley, D.E. and Wing, R.R. : The effect of short periods of caloric restriction on weight loss and glycemic control in type 2 diabetes *Diabetes Care*, **21**, 2-8 (1998)
- Fridovich, I. : Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1-15 (1986)
- Miquel, J. : Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*, Miquel, J., Quantanilha, A.T. and Weber, H. (eds.), CRC Press, Florida, Vol. 1, p 3-16 (1989)
- Proctor, P.H. : Free radicals and human disease. In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*, Miquel, J., Quantanilha, A.T. and Weber, H. (eds.), CRC Press, Florida, Vol. 1, p 209-222 (1989)
- Hallwell, B. and Gutteridge, J.M.C. : Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease An overview. In *Methods in Enzymology*, Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 186, p.1-85 (1990)
- Sakurai, T. and Tsuchiya, S. : Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett.*, **236**, 406-410 (1988)
- Mullarkey, C.J., Edelstein, D. and Brownlee, M. : Free radical generation by early glycation products' a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 932-939 (1990)
- Vega, P., Gaule, C., Mancilla, J., Del Villar, E. : Comparison of alloxan and streptozotocin induced diabetes in rats: differential effects on microsomal drug metabolism *Gen. Pharmacol.*, **24**, 489-495 (1993)
- Rabinovitch, A. : Animal models of type 1 diabetes are relevant to human IDDM—use caution. *Diabetes Metab. Rev.*, **14**, 189-190 (1998)
- Scott, F.W., Cloutier, H.E., Kleemann, R., Woerz-Pagenstert, U., Rowsell, P., Modler, H.W. and Kolb, H. : Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells. *Diabetes*, **46**, 589-598 (1997)
- Wada, R., Koyama, M., Mizukami, H., Odaka, H., Ikeda, H. and Yagihashi, S. : Effects of long-term treatment with alpha-glucosidase inhibitor on the peripheral nerve function and structure in Goto-Kakizaki rats—a genetic model for type 2 diabetes *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **15**, 332-337 (1999)
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. and Natori, T. : Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain *Diabetes*, **41**, 1422-1428 (1992)
- Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Dabes, T.T., Stegink, L.D., Diekus, M. and Oberley, L. : Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, **35**, 503-507 (1986)
- Loven, D.P., Schedl, H.P., Oberley, L.W., Wilson, H.D., Bruch,

- L and Niehaus, C.N. : Superoxide dismutase activity in the intestinal mucosa of the streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology*, **111**, 737-742 (1982)
- 18 Hagglof, B., Marklund, S.L. and Holmgren, G. : Cu, Zn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocyte and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinologica*, **102**, 235-239 (1983)
- 19 Ohneda, M., Inman, L.R. and Unger, R.H. : Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. *Diabetologia*, **38**, 173-179 (1995)
- 20 Ramesh, B. : Dietary management of pancreatic beta-cell homeostasis and control of diabetes. *Med. Hypotheses*, **46**, 357-361 (1996)
- 21 Crapo, C.H., McCord, J.M. and Fridovich, I. : Preparation and assay of superoxide dismutase, In *Methods in Enzymol.* Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic press, New York, Vol. 53, p.382-393 (1978)
- 22 Aebi, H. : Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Graßl, M. (eds.), 3rd ed., Verlag chemie, Vol. 3, p.273-286 (1983)
- 23 Flohe, L., Wolfgang, A. and Gunzler, W.A. : Assay of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymol.*, Packer, L. (ed), New York, Academic Press, Vol 105, p 114-121 (1984)
24. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymol.*, Packer, L.S. (ed), New York, Academic Press Inc, Vol. 52, p.302-310 (1978)
25. Lowry, C.H., Rsenbrough, N J, Farr, A L. and Randall, R J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-277 (1951)
26. Park, P.S., Koh, C.N. and Park, J Y : Effects of total dietary restriction on the contents of thiobarbituric acid-reactive substance and antioxidant enzymes in the liver and kidney of rats. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.*, **28**, 471-476 (1999)
- 27 Rao, G., Xia, E., Nadakavukaren, M.J. and Richardson, A. : Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr.*, **120**, 602-609 (1990)
28. Xia, E., Rao, G., Van, R.H., Heydari, A.R. and Richardson, A. : Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr.*, **125**, 195-201 (1995)
29. Lammi-Keefe, C J, Swan, P.B. and Hegarty, P.V. : Effect of level of dietary protein and total or partial starvation on catalase and superoxide dismutase activity in cardiac and skeletal muscles in young rats. *J Nutr.*, **114**, 2235-2240 (1984)
30. Albrecht, R., Pelissier, M A, Atteba, S and Smail, M : Dietary restriction decreases thiobarbituric acid-reactive substances generation in the small intestine and in the liver of young rats. *Toxicol. Lett.*, **63**, 91-96 (1992)

(2001년 3월 3일 접수)