

스트렙토조토신 - 당뇨쥐에서 지질과산화 및 항산화계의 경시적 변화

이수자 · 박수현 · 이해성[§]

경북대학교 식품영양학과

Changes in *in vivo* Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense System in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: a Time Course Study

Lee, Su-Za · Park, Soo-Hyun · Lee, Hye-Sung[§]

Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to examine a part of the mechanism for the etiology of diabetic complications. Thirty normal and forty streptozotocin(STZ)-induced diabetic rats were used as the animal models. The animals were sacrificed at the time points of 3 days, 1, 2, 4 and 6 weeks after STZ-injection and a time course changes in the concentrations of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in blood, urine, and tissues, along with the levels of conjugated dienes in tissues were measured as indices of *in vivo* lipid peroxidation. The activities of antioxidant enzymes, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and the levels of blood retinol and alpha-tocopherol were also measured. The diabetic rats maintained a slightly higher plasma TBARS level throughout the experiment. The urinary TBARS level was significantly higher in diabetic group and gradually increased with time. Concentrations of TBARS in liver, heart, and kidney tissues from diabetic animals were higher than those from the normal group. An increase of conjugated dienes was also observed in the all tissues examined. The kidney tissue of diabetic animals revealed more significant lipid peroxidation state than any other organ tissues. The activities of hepatic antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase were higher in diabetic animals compared to the control ones and increased with the duration of diabetes mellitus. The plasma levels of vitamin A and E were lower in diabetic animals than in normal controls throughout the experimental period. The level of vitamin E in diabetic animals was significantly decreased with the duration of the disease. The results of this study suggest that an effective regimen to suppress the adverse changes in lipid peroxidation and antioxidant defense system is required from the early stage of the disease to prevent the development of diabetic complications. (*Korean J Nutrition* 34(3) : 253~264, 2001)

KEY WORDS: diabetes mellitus, streptozotocin-diabetic rat, lipid peroxidation, antioxidant defense.

서 론

만성대사질환인 당뇨병(Diabetes mellitus)은 일정기간의 유병 기간이 지나면 고혈압, 동맥경화증, 당뇨성 망막증, 신증, 말초 신경증, 고지혈증 등의 합병증을 일으키는 것으로 보고되고 있다.¹⁾ 의학의 발달로 인해 당뇨병 환자의 수명이 연장됨에 따라 당뇨병성 만성합병증이 증가되기 시작하였으며 그 중에서도 대혈관병증(macroangiopathy)인 관상동맥질환, 뇌혈관질환 및 말초혈관질환 등은 당뇨병 환자의 주요사인이 된다. 당뇨병 환자에서 여러 가지 합병증이 발생하는 시기나 부위 또는 병변의 정도는 매우 다양하

며 유전적, 대사적, 환경적인 인자들이 관여하는 것으로 보이나 아직 그 기전은 명확히 알려져 있지 않으며 이들 합병증으로 인해 당뇨병 환자의 기대 수명은 건강한 정상인에 비해 약 20~30%까지 감소된다.

당뇨병 합병증의 발생은 당뇨병 상태에서 증가된 산화 스트레스와 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되고 있다.^{2,3)} 산화 스트레스는 산소로부터 만들어지는 유리기의 생성량과 체내 항산화 방어력 사이의 불균형이 초래된 상태를 말한다. 최근 연구에 의하면 당뇨병 환자에서 가장 흔한 심혈관 질환 합병증의 가장 중요한 위험인자 중의 하나가 혈장과 조직내의 산화 스트레스의 증가로 인한 지질과산화물의 증가이며, 지질 과산화물이 혈관조직을 침해하여 세포손상을 가져오는 것으로 보고된 바 있다.^{4,6)} 1979년 Sato등⁷⁾이 당뇨병 환자의 혈장에서 지질 과산화물이 증가되어 있음을 처음 발견한 이래 당뇨병에서 지질 과산화가 증가된다는 것이

접수일 : 2001년 2월 14일

채택일 : 2001년 3월 26일

[§]To whom correspondence should be addressed.

여러 연구에서 밝혀져 이를 뒷받침하고 있다. Wada 등⁹⁾은 당뇨쥐에서 과산화적 손상에 의해 지질 과산화물의 축적이 증가되고 혈청 중 중성지질 수준이 증가된다고 보고했으며 Morel 등¹⁰⁾은 스트렙토조토신 유발 당뇨쥐에서 지질 과산화물이 증가되고 혈장 지단백 중 VLDL과 LDL의 산화가 촉진되고 이에 의한 세포 독성이 나타났다고 보고하였다. 당뇨병에서의 지질 과산화의 증가정도는 당화 혈색소 및 혈당의 조절 정도, 유병 기간, 연령, 혈관 합병증의 유무 등과 상관관계가 있으며, 이러한 지질 과산화의 증가는 생체 막의 구조와 기능의 변화 등을 통하여 당뇨병의 합병증 발생과 연관될 수 있음이 보고되었다.¹⁰⁾ 당뇨병 상태에서 산화스트레스가 어떻게 증가하는지에 대해서는 밝혀지지 않았으며 단지 비효소적 당화(nonenzymatic glycosylation)와 자동산화적 당화(autoxidative glycosylation)의 증가, 항산화방어계(antioxidant defense system)의 변화 등이 이 과정에 관여할 것으로 추측하고 있다.¹¹⁾

산소 유리가 당뇨병을 포함한 인간의 여러 질병의 병인에 중요한 역할을 한다고 알려진 이래 산화스트레스와 그로 인한 조직손상과 항산화 방어기전에 대한 관심이 증대되어 왔으며 특히 당뇨병에서 항산화제의 상태 변화와 항산화효소의 활성도는 많은 연구의 대상이 되어왔다. Saleh 등¹²⁾은 스트렙토조토신 유도 당뇨쥐의 간과 신장에서 항산화 효소, superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT)의 감소를 보고하였으며 Bruno 등¹³⁾은 소아 당뇨병 환자의 적혈구에서 CuZn-SOD가 유의하게 감소한 반면, CAT는 변화를 보이지 않았다고 하였으며 Kesavulu 등¹⁴⁾도 같은 결과를 보고하였다. Kesavulu 등¹⁴⁾은 또한 glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성도를 조사하여 당뇨병의 이환기간이 오래될수록 GSH-Px의 활성이 더욱 감소되었다고 보고하였다. 그러나 이와는 상반되는 결과로서 STZ으로 유발시킨 당뇨쥐를 모델로 간, 심장, 신장, 췌장 중의 항산화 효소 활성을 관찰한 Kakkar 등¹⁵⁾의 보고에서는 당뇨쥐에서 간조직 중의 CAT 활성은 정상군에 비해 51.7% 더 높았고 SOD 활성은 정상군에 비해 유의적으로 증가되는 경향을 보였으며 GSH-Px 활성은 당뇨군에서 높기는 하였으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 이와 같이 당뇨병 상태에서의 항산화 방어계에 대한 연구결과들은 일관성이 결여되어 있으므로 합병증 발병의 기전을 이해하기 위해서는 당뇨병에서 일어나는 항산화 방어계의 변화에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 본다.

이처럼 당뇨병 합병증의 발병은 지질대사 이상과 지질 과산화의 급격한 진전, 항산화 방어계의 저해로 인해 야기되는 것으로 추정되고 있으나 이러한 당뇨병의 진전과 합병증

의 발병이 시간경과에 따라 어떤 시점에서부터 어떠한 기전을 통해 진행되는지에 대한 체계적인 보고는 드문 상태이다. 따라서 본 연구는 STZ으로 유발시킨 당뇨쥐를 모델로 하여 당뇨병의 진행에 따른 생체내 지질대사와 지질과산화 상태 및 항산화 방어계의 경시적 변화를 측정하여 합병증 발생의 시기와 기전의 일부를 규명하고자 하는 목적으로 수행되었다. 이를 위하여 전보¹⁶⁾에서 당뇨쥐의 유병기간에 따른 혈중 지질 패턴과 동맥경화 지수의 변화를 보고한 바 있으며 그 결과 당뇨동물의 혈중 지질패턴의 변화는 발병 후 1주일이내의 매우 초기단계에서 시작됨을 밝힌 바 있다. 본 논문에서는 당뇨병 동안 다양한 조직에서의 유리기 대사의 변화들을 관찰하기 위해 혈액, 뇨, 간, 신장, 심장 등의 조직에서의 지질 과산화의 진행과정을 측정하였으며 아울러 당뇨병의 진전에 따른 항산화 방어계의 변화를 관찰하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물 및 식이

Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 70마리를 체중 300g 정도의 성숙쥐로 성장할 때까지 사육한 다음 실험식으로 1주일간 적응시키고 평균 체중이 유사하도록 2군으로 임의로 나누고 그 중 한 군(40마리)은 실험적으로 당뇨를 유발시켜 당뇨군으로 하고 다른 한 군(30마리)은 정상 대조군으로 하였다. 당뇨군은 평균 체중과 혈당이 유사하도록 각 군당 8마리씩 다시 5군으로 나누고 정상 대조군은 평균 체중이 유사하도록 각 군당 6마리씩 5군으로 나누어 실험식과 물을 제한없이 6주간 급여하였다. 실험식은 AIN-76 정제식이 조성으로 전보¹⁶⁾와 동일하며 식이는 매주마다 신선하게 제조하여 식이 성분의 지질과산화로 인한 영향을 배제하였다. 당뇨군과 대조군은 당뇨 유발 후 3일째, 1, 2, 4, 6주째에 각 1군씩 희생시켰다.

2. 실험방법

1) 당뇨병의 유도

당뇨군의 동물에 스트렙토조토신(50mg/kg BW)을 대퇴부 근육에 1회 주사함으로써 실험적으로 중등도 당뇨병을 유발시켰으며 유발과정과 당뇨병의 확인은 전보¹⁶⁾와 같은 방법에 의하였다.

1) 채 뇨

뇨 시료의 수집을 위해 한 마리씩 대사 사육장에 36시간 수용하여 물은 자유롭게 공급하고 사료는 공급하지 않았다.

12시간 공복 상태를 유지한 후 체중을 달고 나머지 24시간 동안 소변을 수집하였다. 소변 수집전 12시간 동안 공복을 유지한 이유는 소변중 지질과산화물의 측정에 영향을 미칠 수 있는 외인성 지질과산화물의 영향을 배제하기 위한 것이다. 뇨 시료는 방부제로서 toluene 수적을 포함한 50ml graduated centrifuge tube에 수집하여 정확한 부피를 측정 한 후 원심분리시켜 상층액을 분석시까지 -70℃에 보관하였다.

2) 제혈 및 조직의 채취

희생 전날 밤 실험 동물을 12시간 절식시킨 후 다음날 아침 복부 하대정맥(inferior vena cava)에서 혈액을 채취하고 3000rpm에서 20분간 원심분리해서 혈장을 분리하여 분석시까지 -70℃에서 보관하였다. 혈액을 채취한 다음 즉시 간, 신장, 심장 및 폐조직을 적출하여 냉장 생리 식염수로 수회 세척 후 수분을 제거하고 칭량한 후 액체질소로 급속 냉동시켜 -70℃에 분석시까지 보관하였다.

3) Thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS) 측정

혈장과 뇨 중 과산화물 측정은 Tarladgis의 방법¹⁷⁾에 따라 TBA 반응물질을 측정하였다. 즉 혈장과 뇨 시료 0.5ml에 3ml의 5% trichloroacetic acid와 1ml의 0.06 M thiobarbituric acid를 넣고 잘 혼합하여 80℃의 수조에서 90분간 가열한 후 실온으로 냉각시켜 2000rpm에서 원심분리하여 상층액의 흡광도를 535nm에서 측정하였다. 뇨 중 creatinine은 Jaffe반응법에 준한 kit(신양화학약품)를 사용하여 측정하였다. 뇨 중의 TBARS가를 creatinine 배설량과 관련하여 표시할 경우 보다 큰 통계적 유의성을 가진다는 Nelson 등¹⁸⁾의 보고에 따라 결과는 nmoles MDA/ μ moles creatinine으로 나타내었다. 간, 신장 및 심장조직 중의 과산화물 측정은 Uchiyama와 Mihara의 방법¹⁹⁾에 따라 측정하였다. 즉 0.5g의 조직에 9배 부피의 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 넣어 homogenizer(Kinematica AG, Swizerland)로 마쇄한 후 0.5ml의 homogenate를 취하여 3ml의 1% phosphoric acid와 1ml의 0.6% TBA를 넣어 잘 혼합하였다. 이것을 boiling water bath에서 45분간 가열한 뒤 4ml의 n-butanol로 발색물질을 추출한 후 3000rpm에서 원심분리하여 butanol 상층액의 흡광도($A_{535-520}$)를 측정하였다.

4) Conjugated dienes 측정

조직 중 conjugated dienes(CD)는 Recknagel와 Glende의 방법²⁰⁾에 따라 측정하였다. 간, 신장 및 심장조직을 일정량(0.5g) 취하여 냉각된 buffer용액(150mM KCl, 1mM

EDTA, 50mM Tris/HCl, pH 7.4)으로 2~3회 세척하여 혈액을 제거한 후 4배량의 buffer로 homogenize(Kinematica AG, Swizerland)시켰다. 균질액을 1,000×g에서 5분간 원심분리한 후 그 상층액 0.4ml를 취하여 chloroform과 methanol 혼합액(2:1, v/v) 6ml를 첨가하고 1분간 vortex한 뒤 이 혼합액을 3,000×g에서 20분간 제원심분리한 후 chloroform층을 2ml 취하여 50℃에서 용매를 증발시켰다. 추출된 지질을 3ml의 cyclohexane에 녹여 250nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈장 비타민 A와 비타민 E 측정: Bieri 등²¹⁾의 HPLC방법에 의해 혈중의 비타민 A와 비타민 E를 동시 측정하였다. 혈장 200 μ l에 internal standard로서 α -tocopheryl acetate와 retinyl acetate를 각각 100 μ 씩 잘 섞은 후 HPLC용 heptane 200 μ l를 첨가하여 vortex하였다. 이것을 1500rpm에서 원심분리하여 상층 heptane만을 취하여 지질을 추출한 뒤 0.45 μ m membrane filter(Millipore corporation, Bedford, MA 01730)로 여과하여 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 지질 추출물을 diethyl ether/methanol (1/3) 혼합액에 용해시킨 후 HPLC(Waters 500)로 분석 정량하였다.

5) 항산화효소원의 조제

체혈 후 간조직은 즉시 적출한 후 0.9% 생리식염수로 수회 세척하고 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 그리고 각 간엽에서 고르게 일정량(2g)을 취하여 조직 1g당 0.25M sucrose용액을 5배 가하고 빙냉상태에서 glass teflon homogenizer(Glascol, 099C K44, USA)로 마쇄하였다. 마쇄액은 600×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻었다. 그리고 상층액은 다시 105,000×g에서 1시간 동안 ultracentrifuge(Beckman, Optima TLX-120)하여 cytosol과 microsome 분획을 분리하고 cytosol 분획은 glutathione peroxidase(GSH-Px)와 superoxide dismutase(SOD) 활성 측정에 사용하였다. Mitochondria 분획은 0.25M sucrose용액에 재현탁시킨 다음 제원심분리하여 침전물을 얻고 다시 0.25M sucrose용액에 현탁시켜 catalase(CAT)활성 측정에 사용하였다.

6) Catalase 활성 측정

CAT 활성도는 Aebi의 방법²²⁾으로 측정하였다. 즉 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.89ml에 기질인 30mM H₂O₂ 100 μ l를 넣어 25℃에서 5분간 incubation시켰다. 그 후 효소원 mitochondria현탁액 10 μ l를 가하여 3.0ml가 되게 하고 이것을 25℃로 온도가 조절된 spectrop-

hotometer(Beckman Model DU-650)를 이용하여 240 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다. H₂O₂의 흡광도 변화와 H₂O₂의 몰흡광계수로부터 H₂O₂의 농도를 구한 다음 감소된 H₂O₂ nmol/min/mg protein으로 효소활성도를 계산하여 나타내었다.

7) Superoxide dismutase 활성 측정

SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동 산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법²³⁾으로 측정하였다. 즉, 50mM Tris HCl buffer(10 mM EDTA 함유, pH 8.6) 2.8ml와 15mM의 pyrogallol 0.1 ml를 혼합하여 5℃에서 5분간 미리 incubation시킨 후 효소원 cytosol액 0.1ml를 가하여 최종 반응액이 3.0ml가 되도록 하였다. 이 반응액을 25℃에서 10분간 반응시킨 다음 1 N HCl 0.1ml를 가하여 반응을 종료시키고 440nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산출하였다. 효소 활성의 unit는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 15mM pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는 단백질의 양으로 정하였다.

8) Glutathione peroxidase 활성 측정

GSH-Px 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법²⁴⁾으로 산화형 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH에 의하여 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340nm에서 감소하는 정도를 측정하였다. 즉 0.1M Tris HCl(pH 7.2)buffer 2.6ml와 30mM 환원형 glutathione 0.1ml를 넣고 6mM NADPH 용액(0.1M Tris buffer NADPH, 5µg/ml) 0.1ml에 6.25µM H₂O₂를 넣은 뒤 25℃에서 5분간 먼저 preincubation시킨 뒤 여기에 0.1ml의 효소원 cytosol액을 혼합하여 25℃에서 5분간 더 incubation시킨 뒤 340 nm에서 흡광도변화를 측정하였다. 효소 활성의 1unit는 1분간 1nmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양을 나타내었다.

9) Mitochondria와 cytosol fraction의 단백질 함량 측정

간조직의 mitochondria와 cytosol 분획의 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Lowry 등²⁵⁾의 방법에 의해 정량하였다.

3. 통계 처리

실험 결과는 SPSS 통계 package를 이용하여 평균치와 표준 오차를 구하였으며, 정상군과 당뇨군간의 차이는 Student's t-test에 의해, 당뇨유발 후 유병기간에 따른 차이의 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan's multiple comparison test²⁶⁾에 의해 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

1. 혈장과 뇨 및 조직 중의 지질 과산화 상태의 변화

1) 혈장과 뇨 중의 지질 과산화물 수준

당뇨쥐에서 혈장과 뇨 중의 지질 과산화물 함량을 유병 기간에 따라 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 정상동물은 1주째를 제외하고는 비교적 일정한 수준의 혈중 과산화물 수준을 유지하였다. 당뇨군의 유병 기간에 따른 혈장 지질과산화물의 변화는 당뇨 유발 1주 째에는 초기 값보다 낮아졌다가 그 후 다시 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 당뇨군의 혈장중 지질과산화물의 농도는 정상군에 비해 실험 전 기간동안더 높은 수준을 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

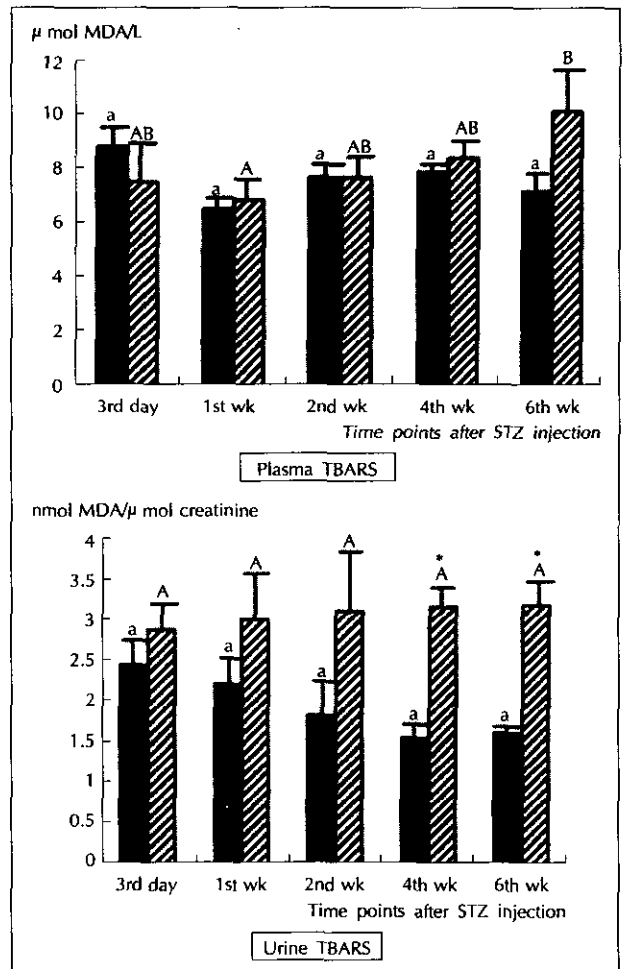


Fig. 1. The levels of plasma and urine TBA-reactive substance(TBARS) in normal and STZ-induced diabetic rats. Each bar represents the mean ± S.E of each group(■: normal n=6, ▨: diabetic n = 5-8). Different letters in the same group indicate significant difference(p < 0.05) between time points after STZ injection by multiple comparison test. *significantly different from normal group at p < 0.05 by Student's t-test.

노 중의 TBARS 수준은 정상군에서는 성장에 따라 점차적으로 감소하는 경향을 보인 반면 당뇨군에서는 정상군에 비해 전기간에 걸쳐 높은 경향을 보였다. 당뇨 유발 2주까지는 정상군과 당뇨군 사이에 유의적인 차이를 관찰할 수 없었으나 4주째부터 당뇨군에서 노 중 지질 과산화물의 배설량이 정상군에 비해 유의적인 차이를 보이면서 증가하였다. 당뇨 유발 6주 후, 당뇨쥐의 노 중 TBARS 함량은 3.18 nmol MDA/ μ mol creatinine으로서 정상군의 1.63nmol MDA/ μ mol creatinine에 비해 95% 더 높은 수준을 나타냈다.

2) 조직 중의 지질 과산화물 수준

조직중의 지질 과산화의 정도는 conjugated diene(CD)과 TBA 반응물질(TBARS)의 측정에 의해 관찰하였다. 지질과산화의 초기 단계의 지표가 되는 conjugated diene (CD)의 수준을 각 조직별로 측정된 결과는 Table 1과 같다. 당뇨동물의 조직중의 CD 수준은 모든 조직에서 전 실험기간에 걸쳐 정상동물에 비해 높게 나타났으며 유병 기간

이 길어짐에 따라 높은 값을 나타내었다. 간조직과 심장조직은 발병 1주일부터 유의적인 차이를 나타내었고 신장조직은 2주째부터 유의적인 차이를 보였다. 당뇨 유발 6주 후의 당뇨군의 각조직의 CD 수준은 정상군에 비해 간조직에서는 36%, 심장조직에서는 44%, 신장조직에서는 71% 더 높았다.

조직 중 TBARS의 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 당뇨동물의 조직중 TBARS 함량도 역시 모든 조직에서 실험 전기간에 걸쳐 정상군에 비해 높은 경향을 나타내었다. 당뇨동물의 간조직중의 지질 과산화물 수준은 유병 기간에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았으나 당뇨유발 초기부터 정상동물에 비해 높은 수준을 보였으며 당뇨 유발 6주째에는 유의적인 차이를 보였다. 당뇨군의 심장조직 중의 과산화물 수준은 유병 기간의 경과에 따라 지속적이며 완만한 증가를 보이다가 6주째에 현저하게 증가되어 정상군에 비해 유의적인 차이를 나타냈다. 신장조직 중의 지질 과산화물 수준은 당뇨군에서 경시적으로 증가되는 경향을 보였고 발병 3일째 초기부터 정상군에 비해 유의적으로 높

Table 1. TBARS¹⁾ levels in liver, heart and kidney tissues of normal and STZ¹⁾ induced diabetic rats (nmol MDA¹⁾/g tissue)

Time points after STZ injection	Liver		Heart		Kidney		
	Group ¹⁾	N	D	N	D	N	D
3rd day		243.8 \pm 9.9 ^{2ab3)}	265.6 \pm 4.1 ^a	229.2 \pm 15.9 ^{ab}	233.8 \pm 9.7 ^a	329.2 \pm 19.4 ^a	396.2 \pm 15.6 ^{a*}
1st wk		210.1 \pm 15.1 ^{ab}	256.1 \pm 10.6 ^{a*}	204.8 \pm 9.0 ^a	259.1 \pm 8.6 ^b	346.7 \pm 5.1 ^a	407.8 \pm 13.3 ^{a*}
2nd wk		188.4 \pm 11.6 ^a	230.5 \pm 26.2 ^a	246.0 \pm 8.7 ^{bc}	268.6 \pm 5.3 ^b	430.6 \pm 12.2 ^c	453.6 \pm 39.6 ^{ab}
4th wk		207.3 \pm 15.8 ^{ab}	246.0 \pm 11.7 ^a	254.7 \pm 7.7 ^{bc}	282.1 \pm 9.7 ^b	381.0 \pm 5.8 ^b	481.4 \pm 35.9 ^{ab*}
6th wk		223.2 \pm 12.5 ^{ab}	271.0 \pm 15.8 ^{a*}	276.2 \pm 12.2 ^c	342.7 \pm 4.3 ^{c*}	388.0 \pm 5.2 ^b	515.8 \pm 30.0 ^{b*}

1) N: normal, D: diabetic, STZ: streptozotocin, TBARS: thiobarbituric acid-reactive substance, MDA: malondialdehyde
 2) Each value represents the Mean \pm S.E of each group(normal n = 6, diabetic n = 5 - 8)
 3) Different superscripts in the same colum indicate significant difference(p < 0.05) between time points after STZ injection by Duncan's multiple comparison test
 4) *Significantly different from normal group at p < 0.05 by Student's t-test

Table 2. Conjugated dienes levels in liver, heart and kidney tissues of normal and STZ¹⁾-induced diabetic rats (Δ O.D/mg of lipid content) \times 10

Time points after STZ injection	Liver		Heart		Kidney		
	Group ¹⁾	N	D	N	D	N	D
3rd day		7.71 \pm 0.22 ^{2ab3)}	10.22 \pm 2.33 ^a	12.92 \pm 0.37 ^a	15.81 \pm 1.08 ^a	21.40 \pm 2.94 ^a	27.50 \pm 4.22 ^a
1st wk		6.07 \pm 0.43 ^a	8.90 \pm 0.77 ^{a*}	15.84 \pm 1.18 ^{ab}	24.55 \pm 3.09 ^{b*}	16.71 \pm 1.89 ^a	42.06 \pm 10.29 ^{ab}
2nd wk		8.15 \pm 0.89 ^b	12.21 \pm 1.47 ^{a*}	21.66 \pm 1.35 ^c	27.99 \pm 2.60 ^{b*}	23.68 \pm 3.75 ^a	52.50 \pm 6.06 ^{b*}
4th wk		8.95 \pm 0.34 ^b	12.33 \pm 1.01 ^{a*}	19.16 \pm 2.41 ^{bc}	25.76 \pm 1.20 ^{b*}	20.26 \pm 1.96 ^a	53.21 \pm 4.22 ^{b*}
6th wk		8.97 \pm 0.86 ^b	12.20 \pm 0.84 ^{a*}	21.08 \pm 2.23 ^c	30.45 \pm 3.89 ^b	49.81 \pm 5.99 ^b	85.22 \pm 7.02 ^{c*}

1) N: normal, D: diabetic, STZ: streptozotocin
 2) Each value represents the Mean \pm S.E of each group(normal n = 6, diabetic n = 5 - 8)
 3) Different superscripts in the same colum indicate significant difference(p < 0.05) between time points after STZ injection by Duncan's multiple comparison test
 4) *Significantly different from normal group at p < 0.05 by Student's t-test

은 수준을 유지하였다. TBARS 측정에 의한 지질과산화 정도는 신장조직이 심장과 간조직에 비해 높게 나타났다. 결과적으로 조직중의 conjugated diene과 TBARS의 측정에서 관찰해 볼 때 당뇨병동물들은 정상동물에 비해 조직의 지질과산화 정도가 높다는 것을 알 수 있으며 특히 신장조

직은 보다 높은 지질과산화가 진행됨을 볼 수 있었다.

2. 항산화 방어계의 변화

1) 간조직 중 항산화효소의 활성 변화

간조직 중의 항산화효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. CAT 활성은 정상군과 당뇨병군 사이에서 전 실험기간에 걸쳐 유의적인 차이를 보이지 않았다. 당뇨병군의 경우, CAT 활성은 당뇨 유발 1주 째까지 정상군 수준에 비해 낮은 경향을 보이던 것이 2주 째에 접어들면서 정상군보다 높게 증가된 후 이러한 경향이 실험 종료시점인 6주 째까지 유지되었다. 당뇨병동물의 유병기간에 따른 CAT 변화는 4주 째까지는 활성증가를 보이다가 6주 째는 유의적으로 감소하였으나 정상군에 비해서는 20% 더 높은 활성을 보였다. SOD 활성 역시 전기간에 걸쳐 당뇨병군이 정상군보다 다소 높게 유지되는 경향이었으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 당뇨병군의 경우, 당뇨 유발 2주 째까지 비슷한 활성수

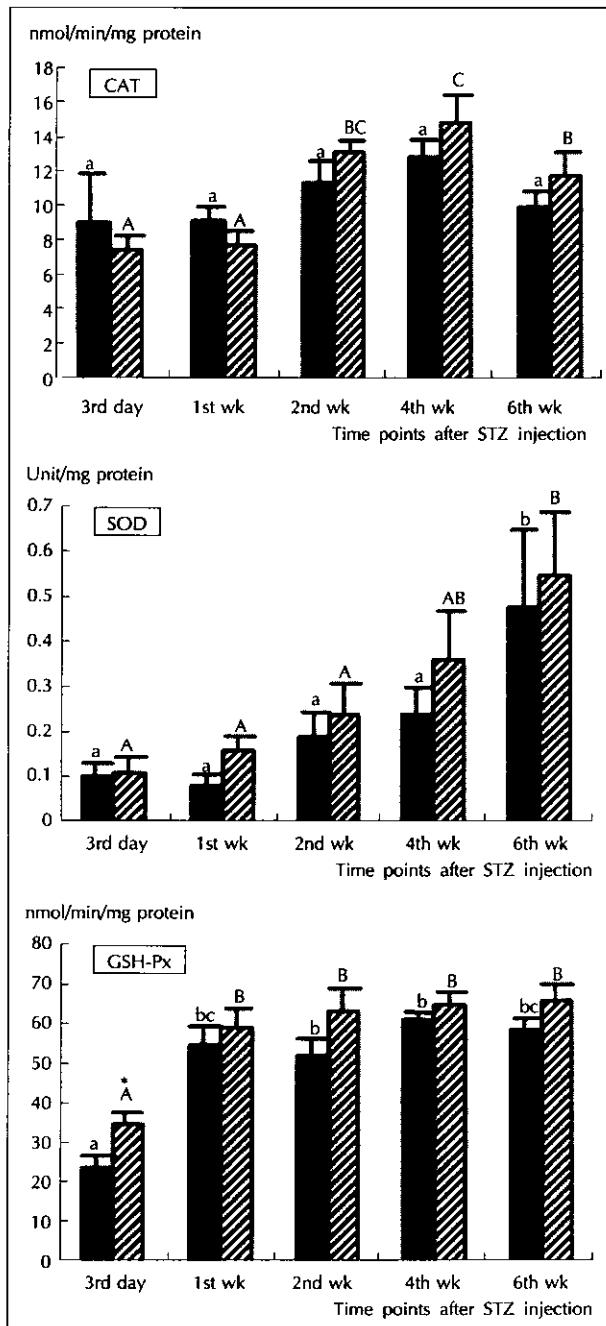


Fig. 2. Antioxidant enzyme activities in liver tissue in normal and STZ-induced diabetic rats. Each bar represents the mean \pm S.E of each group (■: normal n = 6, ▨: diabetic n = 5-8). Different letters in the same group indicate significant difference ($p < 0.05$) between time points after STZ injection by multiple comparison test. *significantly different from normal group at $p < 0.05$ by Student's t-test.

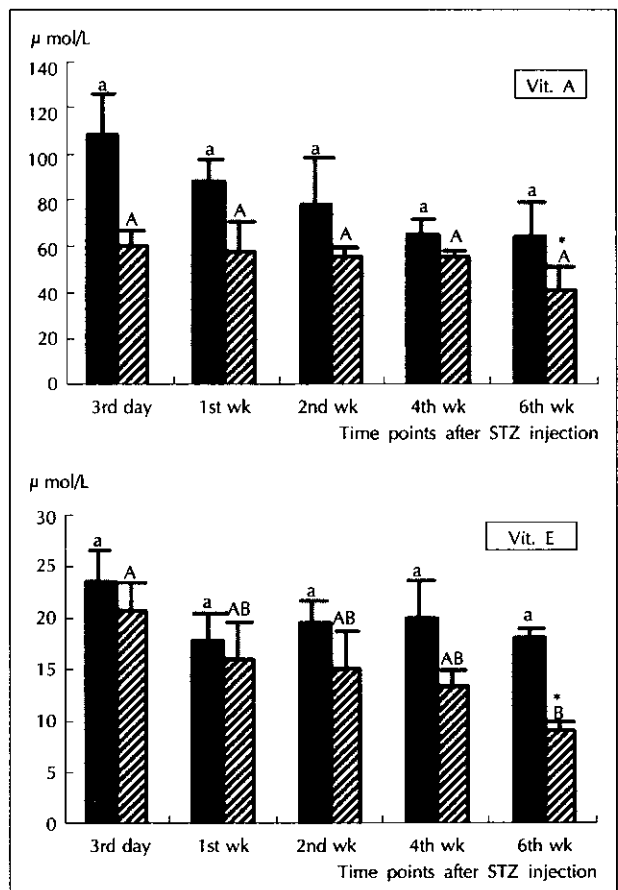


Fig. 3. Plasma levels of vitamin A and E in normal and STZ-induced diabetic rats. Each bar represents the mean \pm S.E of each group (■: normal n = 6, ▨: diabetic n = 5-8). Different letters in the same group indicate significant difference ($p < 0.05$) between time points after STZ injection by multiple comparison test. *significantly different from normal group at $p < 0.05$ by Student's t-test.

준을 유지하다가 실험 후반기로 접어들면서 유의적인 증가를 나타내었다. 당뇨 유발 6주 후의 SOD 활성은 당뇨군이 정상군에 비해 14.6% 더 높았다. GSH-Px 활성도 실험 전 기간에 걸쳐 정상군에 비해 당뇨군의 활성이 높은 경향이었으나 당뇨 유발 3일째를 제외하고는 유의적인 차이는 없었다. 당뇨 유발 6주째 당뇨군은 정상군에 비해 12% 더 높은 활성을 나타냈다.

2) 혈장 중 항산화 영양소의 농도 변화

혈장 중 항산화 비타민 A와 E의 농도는 Fig. 3과 같다. 혈중 비타민 A 농도는 당뇨군에서 발병 초기 3일 째에 급격히 감소하여 4주까지 비슷한 수준을 유지하다가 6주 째에 다시 크게 감소하였다. 정상군에서도 동물의 성장에 따라 혈중 비타민 A의 감소현상이 나타났으며 당뇨동물은 실험 전기간에 걸쳐 정상군에 비해 낮은 수준을 보였다.

혈중 비타민 E 농도도 전기간에 걸쳐 당뇨군이 정상군에 비해 낮은 경향을 보였다. 정상군내에서는 시간경과에 따른 유의적인 변화가 관찰되지 않은 반면, 당뇨군의 경우 당뇨 유발 4주째까지 서서히 감소되는 경향을 보이다가 6주 째에 유의적인 농도저하를 보였다. 당뇨 유발 6주 후의 비타민 A와 비타민 E 함량은 각각 당뇨군이 정상군의 64%와 51% 수준으로 떨어졌다.

고 찰

1. 당뇨병이 혈장과 뇨 및 조직의 지질 과산화물 농도에 미치는 영향

지질 과산화 정도의 지표로는 지질추출물 중의 conjugated diene(CD)과 thiobarbituric acid 반응물질(TBARS), 즉 malondialdehyde (MDA)농도^{27,28)}가 주로 사용되는데 CD는 지질과산화의 초기단계를 반영하며 반면에 TBARS는 과산화지질의 2차 생성물을 나타낸다. 본 실험에서는 이 2가지 지표를 모두 측정함으로써 당뇨동물 체내의 지질과산화 진행상황을 관찰하였다.

본 연구에서 당뇨동물의 혈장 중 TBARS값이 정상동물에 비해 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이가 없었다. 그 이유로는 당뇨상태에서 증가된 조직 중 지질 과산화물의 일부가 간조직의 aldehyde dehydrogenase에 의해 대사되거나 일부는 혈중으로 방출된 후, 사구체 여과율의 증가로 인해 이들 중 상당량이 뇨로 배설되었기 때문으로 추정된다. 이와 같은 사실은 당뇨동물의 뇨중 TBARS의 배설량이 정상동물에 비해 크게 높은 것으로 나타난 본실험의 결과와 타연구^{29,30)}의 보고에 의해서도 입증된다. 그러나 당뇨군의

경우 실험 후반기로 접어들면서 정상군과 유의적이지는 않지만 TBARS 수준이 높아졌는데 이와 같은 현상은 당뇨병의 진행에 따라 지질 과산화물의 생성속도가 대사나 배설속도를 능가함으로써 혈중에 지질과산화물의 축적이 일어난 것으로 보이며 Sato 등²⁹⁾과 Gellou 등²⁷⁾의 연구에서도 보고된 바 있다. STZ 유발 당뇨쥐에서 보여진 뇨 중 TBARS의 증가는 체내에서 비정상적으로 증가된 지질 과산화물을 제거시키려는 보상기전으로 보이며 결국 뇨 중의 지질 과산화물의 축적은 당뇨병 상태에서 체내의 지질 과산화의 증가에 대한 비침해적 지표(noninvasive index)로 사용될 수 있음을 제시한다고 볼 수 있다.

조직 중 지질 과산화의 2차 생성물인 TBARS의 축적 정도는 조직에 따라 다소 차이가 있었다. 간조직 중의 TBARS 함량은 실험 전기간에 걸쳐 당뇨군이 정상군에 비해 높은 경향을 나타내었으며 당뇨군의 유병기간에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 당뇨군의 경우 당뇨 유발 초기부터 2주 째까지는 낮아지는 경향을 보이다가 이후 다시 서서히 증가되는 경향을 보였다. 간조직 중의 TBARS 함량이 초기에 낮은 이유는 당뇨로 인한 산화적 스트레스가 증가함에 따라 당뇨쥐의 간에서 지질 과산화에 대한 방어기전이 작용하여 조직내 과산화물들이 효과적으로 제거된 것으로 보인다. 그러나 당뇨병의 유병 기간이 길어짐에 따라 지질과산화의 정도가 항산화 방어능력을 능가함으로써 간조직 중에 축적되는 지질과산화물의 수준은 높아지는 경향을 나타낸 것으로 추정된다.

심장조직 중의 TBARS 함량 역시 정상군에 비해 당뇨군이 높은 것으로 관찰되었다. 당뇨동물에서 심장조직의 TBARS가 증가한다는 결과는 심실중의 TBARS 수준이 정상군(0.78±0.08nmol/mg phospholipid)에 비해 당뇨군(1.09±0.11nmol/mg phospholipid)이 유의적으로 높았다는 Jain 등³¹⁾과 Kakkar 등¹⁵⁾의 보고와 일치한다. 당뇨로 인한 심장조직의 지질과산화의 증가는 심장조직의 기능이상을 초래하게 되어 당뇨성 심근병증(diabetic cardiomyopathy)의 원인이 될 수도 있다. 당뇨병과 관련하여 나타나는 당뇨성 심근병증의 특징은 수축기능 이상이며, 이로 인해 심장수축장애를 야기시키게 된다. Weiss와 Turk³²⁾가 보고한 바에 따르면, 실험 동물에게 지질 과산화물을 투여했을 때 폐, 심장 등의 평활근에서 과산화물의 농도에 의존적인 혈관수축이 일어났다고 하며, 과산화 지질과 과산화 생성물이 혈관수축에 미치는 영향은 prostacyclin synthetase저해로 인해 강력한 혈관이완제인 prostacyclin 수준이 감소하기 때문인 것으로 보고하였다. 이 경우 산화적 손상과 지질 과산화의 축적이 당뇨병과 관련된 심장의 수축성 변화에

중요한 역할을 하는 것으로 보이며 심근 수축성의 변화는 당뇨병의 주요 합병증으로 대두되는 심근경색, 심장마비, 부정맥 등의 심질환을 일으킬 수 있다.

신장조직 중의 TBARS 수준은 당뇨군에서 경시적으로 꾸준히 증가되는 경향을 보이면서 전기간에 걸쳐 정상군에 비해 유의적으로 높은 수준을 유지하였다. 당뇨군에서 신장조직 중의 지질과산화의 증가정도가 다른 조직들보다 더 현저하였으며 그 차이도 큰 것으로 관찰되었다. 또한 신장조직 중의 지질과산화는 다른 조직에 비해 비교적 일찍부터 시작되는 것으로 보이며 이러한 신장에서의 지질과산화의 빠른 진행으로 인해 신장에 병태적 질환을 심화시키는 것으로 사료된다. 또한 당뇨쥐의 신장에서는 당뇨병 발병 초기에 사구체 여과율이 증가되며 유병기간이 길어지면서 결국에는 신부전(renal failure)을 일으키게 되는데 이것의 일차적인 원인은 사구체 기저막의 비후와 mesangial cell의 여과 잔여물 처리 기능의 감소를 들 수 있다.³³⁾ 이상의 결과에서 조직 중의 TBARS 함량을 기준으로 볼 때, 당뇨동물의 조직 중 신장에서 지질과산화가 가장 크게 일어나고 그 다음이 심장, 간장의 순서임을 알 수 있다.

당뇨동물에 있어서의 산소 유리기에 의한 지질 과산화의 초기단계의 지표가 되는 CD 수준과 지질과산화의 2차 생성물인 TBARS의 축적정도는 간, 신장, 심장의 모든 조직에서 당뇨군에서 전 실험기간에 걸쳐 정상군에 비해 높게 관찰되었으며 유의적인 차이가 나타나기 시작한 시점 및 정도는 조직에 따라 달랐다. 당뇨동물의 각 조직중 초기 지질과산화의 정도를 나타내는 CD수준은 2차 생성물 수준에 비해 정상군과 보다 큰 차이를 보였다. 간조직의 경우 당뇨동물에서의 CD수준과 TBARS 함량은 발병 1주일 쯤부터 정상동물에 비해 유의적으로 높아지기 시작하였으며 심장조직도 초기 지질과산화는 발병 후 1주 쯤부터 역시 당뇨군에서 유의적으로 높은 수준을 나타냈으며 TBARS는 6주 쯤에 유의적인 차이를 보였다. 신장의 경우는 지질과산화의 정도가 유병 기간에 따라 뚜렷이 증가하는 경향을 나타냈고 특히 2차 과산화 생성물의 축적은 발병 3일째부터 정상동물에 비해 유의적인 차이를 보이기 시작했다.

TBARS와 CD 수준을 종합해 볼 때, 당뇨동물에서는 산화적 스트레스의 증가로 인한 조직의 지질 과산화가 발병초기부터 높게 진행됨을 확인할 수 있으며 특히 신장조직에서의 지질과산화의 진행과 생성물의 축적이 다른 조직에 비해 더욱 심하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Parinandi 등³⁴⁾에 의해서도 보고된 바 있어 당뇨쥐의 신장은 간이나 심장에 비해 지질 과산화에 대한 저항성이 낮은 것으로 사료된다. 이것은 당뇨쥐의 신장 사구체 기저막의 구조

변화와 여과율 증가등이 조직의 지질과산화의 증가 등과 어떤 관련이 있을 것으로 추정되나 정확한 기전에 대해서는 더 연구가 필요하다고 본다. Oberley³⁵⁾는 간이나 심장이 신장에 비해 지질과산화에 대한 저항성이 큰 이유로서 당뇨쥐의 간이나 심장에서 글루타티온과 같은 비효소적 항산화제의 수준의 증가와 CAT, SOD, GSH-Px같은 항산화효소의 활성의 증가를 보고하였다.

당뇨병에서 생체내 지질 과산화가 증가하는 주요 원인으로서는 혈당 농도의 상승이 제안된 바 있다. 즉, 혈당 상승이 지질 과산화를 증가시키는 기전으로는 당뇨병 동안의 지속적인 고혈당이 자동산화³⁶⁾와 비효소적 단백질의 당화³⁷⁾를 통해 산소 유리기의 생성을 증가시키고 산소 유리기가 막 인지질의 지질 과산화를 초래하여 MDA를 증가시키게 된다.^{38,39)} 이때 생성된 MDA는 반응성이 높은 물질로 세포의 기능을 손상시키고 lipofuscin의 축적을 초래해 생체에 유해한 영향을 미치며 또한 세포에서 세포로, 조직에서 조직으로 이동될 수 있어 새로운 성분의 파괴를 유도할 가능성도 크다. Jain 등³¹⁾의 실험에서 적혈구세포의 TBA 반응성은 비당뇨 동물과 비교해 볼 때 STZ 유발 당뇨쥐에서 증가되었으나 인슐린 치료로 혈당이 정상화된 동물에서는 TBA 반응성에 있어서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Hunt 등³⁶⁾은 *in vitro* 연구에서의 여러 증거들로부터 포도당이 metal-catalyzed autoxidation 반응에 관여하여 hydroxyl radical을 생성시킨다고 하였다. 이러한 반응성 높은 유리기들은 생체 막에서 PUFA를 공격하여 지질 과산화를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 한편 STZ도 H₂O₂발생을 자극하여 superoxide 음이온과 hydroxyl radical 등의 유리기 생성을 증가시켜 체내 조직의 손상을 유발시킨다고 보고된 바 있다.⁴⁰⁾ 당뇨병 상태에서의 유리기 활성의 증가는 이러한 여러 인자에 의해 유발되며 생체내 각 기관의 지질 과산화의 증가는 혈구세포의 산화적 손상과 막 지질과 단백질간의 가교결합을 일으키며 막 지질 조성의 불안정화, 세포 노화촉진, prostacyclin/prostaglandin 불균형 및 혈관수축을 유발시킬 수 있다.⁵⁾ 유리기의 강한 반응성은 이러한 이유로 노화, 동맥경화, 허혈성 심질환 그 외 당뇨병의 합병증 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

2. 당뇨병이 항산화 방어계에 미치는 영향

본 실험에서 CAT 활성은 정상군과 STZ 유발 당뇨군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며 당뇨 유발 1주 쯤까지는 당뇨군이 정상군보다 낮은 활성 수준을 나타내다가 그 후부터 실험 종료 시점인 6주 쯤까지는 정상군보다 높은 활성을 나타내었다. GSH-Px 활성은 실험 전기간에 걸쳐 정

상군에 비해 당뇨군에서 활성이 높은 경향을 보였으며 당뇨군에서는 당뇨 유발 1주일째 활성이 증가된 이후 유병 기간에 따른 유의적인 변화를 보이지 않았다. 생체내 효소적 항산화 방어계의 하나로서 superoxide 음이온을 환원시켜 H₂O₂로 전환시킴으로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성 역시 전기간에 걸쳐 당뇨군에서 정상군에 비해 높게 유지되었다. 본 실험의 당뇨군에서 간조직 중 CAT, SOD, GSH-Px 활성이 증가되었다는 결과는 당뇨병에서 낮아진 항산화 효소 활성을 관찰한 Matkovic 등,⁴¹⁾ Saleh 등,⁴²⁾ Kesavulu 등⁴³⁾의 보고들과는 상반된 결과를 나타낸 반면 STZ로 유발시킨 당뇨쥐를 모델로 간, 심장, 신장, 췌장 등의 항산화 효소의 활성 증가를 관찰한 Kakkar 등¹⁵⁾의 보고와는 일치하는 것이다.

CAT의 경우, 초기 당뇨군의 활성이 정상군보다 낮았던 이유는 당뇨군의 초기 지질 과산화 정도가 정상군보다 다소 높기는 하지만 유의적으로 증가되지 않음으로서 이 효소의 활성화에 필요한 기질의 농도가 낮았기 때문으로 보이며 실험 후반기로 접어들면서 지질 과산화물의 함량이 현저하게 증가되면서 이에 대한 생체내의 방어기전으로서 이 효소의 활성이 증가된 것으로 추정된다. 실험 후반기에 보여진 CAT 활성의 증가는 생체내의 지질 과산화 증가로 인한 H₂O₂ 생성이 많아짐으로서 일어난 결과로 보인다. H₂O₂는 세포독성을 나타낼 뿐 아니라 세포막을 통과할 수도 있어 세포바깥 환경에서 철, 구리와 같은 전이금속과 반응하여 조적손상을 일으키게 된다. 본 실험에서 CAT 활성은 당뇨 유발 4주째까지는 증가되는 경향을 보이다가 6주째에는 유의적으로 감소하였는데 이것은 당뇨 유발 4주째까지 항산화적 방어작용을 주도하던 CAT가 유리의 과도한 생성 증가로 인해 효소활성이 저해되어⁴²⁾ 나타난 것으로 사료된다.

GSH-Px 활성의 증가는 증가된 산화적 스트레스에 반응하여 나타나는 보상기전이라고 볼 수 있다. 본 실험에서 당뇨동물의 간조직 중 GSH-Px 활성은 당뇨 유발 초기부터 실험 종료 기간까지 유의하지는 않았지만 정상군보다 높은 경향을 나타내었다. 유병 기간에 따른 변화는 당뇨 유발 1주째부터 유의적으로 증가된 후 그 후부터 6주째까지는 비슷한 활성 수준을 보였다. 그러나 CAT보다 활성수준이 더 빨리 증가된 후 실험 전기간에 걸쳐 GSH-Px의 활성이 감소하지 않고 유지된다는 점에서 GSH-Px가 CAT보다 더 지속적이면서도 효과적인 효소적 항산화 방어체계로서 작용하고 있음을 추정할 수 있다.

실험기간 동안 관찰된 SOD의 증가는 당뇨병동안 산소유리기 생성의 증가가 GSH-Px 활성을 증가시키게 되고 이것이 차례로 H₂O₂에 의해 SOD가 불활성화되는 것을 막아

SOD 활성 증가를 가져온 것으로 보인다. 이렇게 하여 나타난 SOD의 활성 증가는 역으로 superoxide 음이온에 의해 CAT, GSH-Px가 불활성화되는 것을 막아 주게 되며⁴³⁾ 결국 이들 세 가지 항산화 효소의 상호협력작용에 의해 활성 증가가 유도된 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 보여진 당뇨군의 간조직에서의 항산화 효소 활성 증가에도 불구하고 당뇨군의 여러 조직에서 TBARS와 CD 함량이 증가한 것은 당뇨상태 하에서는 이들 항산화 효소계의 방어능력을 능가할 정도로 심한 산화적 스트레스가 유지되면서 유리기 생성이 증가되었기 때문으로 추정된다.

항산화 효소계 이외에 또 다른 항산화 방어기구로서 항산화 영양소들이 있다. 이중 혈중 비타민 A(retinol)의 농도 변화는 혈장 retinol의 운반체인 RBP(retinol binding protein)의 농도로서 나타나는데, 본 실험결과 당뇨군의 혈중 비타민 A 농도는 실험 전기간에 걸쳐 정상군에 비해 낮은 것으로 나타났으며 이는 Tuitoek 등⁴⁴⁾과 Basu 등⁴⁵⁾의 보고들과 일치하는 것이다. Tuitoek 등⁴⁴⁾에 따르면 당뇨군에서 혈장 retinol 농도는 감소하는 반면 간조직의 retinol 수준은 증가하는 경향을 보였는데 그는 이것을 당뇨로 인해 식이 섭취량이 증가함으로써 간조직의 retinol의 수준이 증가하기는 하지만 retinol의 운반체로 작용하는 RBP의 생산 및 작용이 저하되어 간으로부터의 retinol 이동상에 결함이 생겨 야기되는 현상으로 설명하였다. 이 외에도 당뇨쥐의 체내에서 증가된 과산화물의 제거나 산화억제 작용에 과다한 retinol이 이용된 것도 또 다른 감소 이유가 될 수 있을 것으로 본다. 한편 혈중 비타민 E(α -tocopherol) 농도도 비타민 A와 유사한 경향을 가지면서 STZ 유발 당뇨군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 NIDDM에서 유리기 활성의 증가와 더불어 혈장의 α -tocopherol 수준이 감소된다고 보고한 Brazy 등⁴⁶⁾ Jain 등,⁴⁶⁾ Shiro 등⁴⁷⁾들의 보고와도 일치하는 경향을 나타낸다. 그러나 이와 대조적으로 당뇨 실험동물의 혈장 비타민 E의 수준이 증가된다는 연구 결과도 보고된 바 있다.⁴⁸⁾ 이번 실험 결과에서 당뇨군의 혈중 비타민 E의 농도가 낮아진 이유는 당뇨쥐의 체내 대사에서 생긴 여러 과산화물의 제거 및 산화억제 작용을 위해 비타민 E의 소모가 많았기 때문으로 짐작된다. 이러한 현상은 당뇨 유발 6주째에 더욱 현저해져서 본 실험에서 당뇨 유발 6주째의 당뇨군의 비타민 E는 정상군의 51% 정도로 낮아지는 경향을 나타냈다. 비타민 E는 특히 생체막에 다량 존재하는 PUFA에 대해 chain-breaking antioxidant로서 작용하여 세포막의 소기관들을 보호함으로써 항산화 효소계의 활성을 높게 유지시켜 주는데 기여한다

고 알려져 있다.⁴⁹⁾ 그 외에도 비타민 E는 lipoprotein lipase의 활성을 증가시킴으로서 VLDL 및 LDL의 분해를 촉진시켜 혈장 및 조직내 콜레스테롤, 중성지질, 총 지질 등의 수준을 저하시킨다고 보고되었으며,⁵⁰⁾ 뿐만 아니라 비타민 E는 지방산 합성 조절 효소인 acetyl-CoA carboxylase 활성을 저해시켜(Irritani & Inoguchi 1990) LDL 지질 조성 중 cholesteryl ester수준을 감소시켜 혈장 lipoprotein의 콜레스테롤 및 지질 감소효과를 가져온다고 알려져 있다.⁵¹⁾ 최근 자료에 따르면 동맥경화성 질환의 발병에서 중요한 원인이 되는 LDL 산화를 억제하는데 비타민 E의 보충이 효과를 보였으며,^{5,52,53)} 이로 인해 비타민 E는 동맥경화 유발을 예방하는 중요한 인자로 인식되고 있다.

본 실험에서는 유병 기간에 따른 당뇨병의 항산화 효소의 활성은 정상군과 통계적 유의성은 없었으나 정상군에 비해 다소 높게 유지된 반면, 항산화 영양소는 당뇨병에서 감소되었으며 이러한 현상이 당뇨 유발 6주 쯤에 더욱 두드러진 경향을 보였다. 그와 함께 지질 과산화 정도는 당뇨병에서 지속적인 증가를 보였으며 당뇨 유발 6주 쯤에 보다 현저한 증가를 보였다. 이로서 추측해 볼때, 당뇨 상태에서는 산화 스트레스 및 지질과산화를 방어하기 위해 항산화 방어계가 정상상태에 비해 보다 더 효과적으로 반응하여 항상성을 유지하려고 하나 지속적이면서도 과도하게 진행되는 지질과산화 작용을 억제하기에는 미흡한 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 당뇨병의 합병증 발생기전의 일부를 규명하고 그 예방책을 강구하고자 하는 목적으로 STZ에 의해 실험적으로 유발시킨 당뇨병을 모델로 하여 당뇨병의 진행에 따른 지질과산화 상태 및 항산화 방어계의 경시적 변화를 측정하였다. 지질과산화 상태의 지표로는 혈액, 뇨, 조직 중의 thiobarbituric acid 반응물질(TBARS)과 conjugated diene(CD) 수준을 측정하였고 항산화 방어계의 변화를 관찰하기 위해서는 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성과 혈중 비타민 A와 E의 농도를 측정하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 당뇨병의 혈장 중의 TBARS 수준은 정상군에 비해 다소 높게 유지되었으나 유의적인 차이는 없었다. 뇨 중 TBARS 함량은 당뇨병이 정상군에 비해 전기간에 걸쳐 높은 경향을 보이면서 유병 기간에 따라 증가되었다.

2) 당뇨병동물의 간, 심장, 신장조직 중 TBA 반응물질의 함량은 실험 전기간에 걸쳐 정상군에 비해 높게 나타났으며

당뇨 유발 6주 후 심장과 신장조직의 TBARS 함량은 정상군에 비해 각각 24%, 33% 높은 수준이었다. 모든 조직의 CD 수준도 당뇨병에서 증가하였으며 신장조직의 CD수준은 유병 기간의 증가에 따라 높아졌다. 당뇨병의 신장조직의 지질과산화 정도는 간이나 심장조직에 비하여 더 심하게 나타났다.

3) catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 등 항산화효소들의 활성은 정상군에 비해 당뇨병에서 비교적 높은 경향을 나타냈으며 당뇨 유발 6주 후에는 정상군에 비해 각각 20%, 14%, 12%의 활성 증가를 보였다.

4) 혈중 비타민 A와 E의 농도는 실험 전기간에 걸쳐 당뇨병이 정상군에 비해 낮게 유지되었으며 특히 당뇨병의 비타민 E 수준은 유병기간의 경과에 따라 유의적으로 감소되었다.

전보¹⁰⁾에서 보고된 당뇨동물에서의 유병 기간에 따른 혈중 중성지방과 콜레스테롤 농도의 유의적인 증가와 함께 본 실험의 결과에서 나타난 혈중 비타민 E의 유의적인 감소가 당뇨동물의 생체내 산화적 스트레스를 증가시켜 조직 중의 지질과산화물의 축적을 가져온 것으로 추정된다. 이와 같은 지질 과산화의 증가는 혈관계 및 조직의 합병증 발생으로 이어질 수 있을 가능성을 제시한다. 당뇨동물에서 뇨 중 지질과산화 생성물의 배설증가와 항산화 효소들의 활성증가는 과산화적 손상으로부터 조직을 방어하기 위한 기전으로 보여지나 조직 중의 지질과산화물의 높은 수준으로 미루어 볼 때, 이와 같은 기전들은 과도한 산화적 스트레스를 억제하기에는 미흡한 것으로 추정된다. 따라서 당뇨합병증의 조기발병 및 진행을 지연시키고 예방하기 위해서 당뇨동물의 비정상적인 지질대사와 항산화 방어계의 변화를 함께 억제할 수 있는 효과적인 관리가 당뇨병 초기부터 적극적으로 시행될 필요가 있다고 본다.

Literature cited

- 1) Tai ES, Lim SC, Tan BY, Chew SK, Heng D, Tan CE. Screening for diabetes mellitus-a two-step approach in individuals with impaired fasting glucose improves detection of those at risk of complications. *Diabet Med* 17(11): 771-775, 2000
- 2) Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412, 1991
- 3) West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17(3): 171-180, 2000
- 4) Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Related Articles. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 398(1): 139-146, 2000
- 5) Jain SK, McVie R, Jaramillo JJ, Ralmer M, Smith T, Meachum ZD, Little RL. The effect of modest vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in di-

- abetic patients. *Lipids* 31: supplement S87-S90, 1996
- 6) Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant Stress in the Vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 1(2): 156-164, 1999
 - 7) Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 21: 104-107, 1979
 - 8) Wada K, Miki H, Etoh M, Okuda F, Kumada T, Kusukawa R. The inhibitory effect of lipid peroxides on the activity of the membrane bound and the solubilized lipoprotein lipase. *Jan Clin J* 47: 837-842, 1983
 - 9) Morel DW, Chisolm GM. Antioxidative treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 30: 1827-1834, 1989
 - 10) Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol* 23(1): 50-62, 2000
 - 11) Andrea Griesmacher MD, Marlene Kindhauser, Sylvia E, et al. Enhanced serum levels of Thiobarbituric-Acid-Reactive Substances in Diabetes Mellitus. *Am J Med* 98: 469-475, 1995
 - 12) Saleh AW, David VG. Alteration in free radical tissue defense mechanism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 36: 1014-1018, 1987
 - 13) Bruno H, Stefan LM, Gosta H. Cu-Zn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin dependent diabetic children. *Acta Endocrinologica* 102: 235-239, 1983
 - 14) Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab* 26(5): 387-392, 2000
 - 15) Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 151: 113-119, 1995
 - 16) Lee, SZ, Lee, HS. Changes in plasma lipid pattern in streptozotocin-induced diabetic rats: A time course study. *Korean J Nutr* 32(7): 767-774, 1999
 - 17) Tarladgis BG, Pearson AM, Duan LR. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. *J Sci Food Agri* 15: 602-607, 1964
 - 18) Nelson GJ, Morris VC, Schmidt PC, Levander O. The urinary excretion of thiobarbituric acid reactive substances and malondialdehyde by normal adult males after consuming a diet containing salmon. *Lipid* 28(8): 757-761, 1993
 - 19) Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by TBA test. *Anal Biochem* 86: 271-278, 1978
 - 20) Recknagel RO and Glende EA Jr. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes: In *Methods in Enzymology*, ed. L. Packer, Academic Press, London, pp.331-337, 1984
 - 21) Bieri G, Toliver JJ, Catignani GL. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red blood cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 32: 2143-2149, 1979
 - 22) Aebi H. Catalase. In "Methods of enzymatic analysis" Bergmeyer HU(ed.), Chemie, Weinheim, F.R.G., pp.673-684, 1974
 - 23) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474, 1974
 - 24) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169, 1967
 - 25) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 26) Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Multivariate data analysis with readings. fourth edition. Prentice-Hall International Editions, USA., 1995
 - 27) Gellou G, Ruelland A, Campion L, Mangendre D, Le Moullec N, Legras B, Allannic H, Cloarec L. Increase in thiobarbituric acid-reactive substances and vascular complications in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolism* 20: 258-264, 1994
 - 28) Chajes V, Sattler W, Stultschning M, Kostner GM. Photometric evaluation of lipid peroxidation products in human plasma and copper oxidized low density lipoproteins: correlation of different oxidation parameters. *Atherosclerosis* 121: 193-203, 1996
 - 29) Lee HS and Csallany AS. The influence of Vitamin E and selenium on lipid peroxidation and aldehyde dehydrogenase activity in rat liver tissue. *Lipids* 29(5): 345-350, 1994
 - 30) Gallaher DD, Csallany AS, Shoeman DW, Olson JM. Diabetes increase excretion of urinary malondialdehyde conjugates in rats. *Lipids* 28: 663-666, 1993
 - 31) Jain SK, Levine SN. Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radical Biology & Medicine* 18(2): 337-341, 1995
 - 32) Weiss ST, Turk J, Needleman PA. Mechanism for hydroperoxide-mediated inactivation of prostacyclin synthetase. *Ablood* 53: 1191-1196, 1979
 - 33) Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Paszkowski J. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney: effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. *IUBMB Life* 49(4): 303-307, 2000
 - 34) Parinandi NL, Thompson EW, Schmid HHO. Diabetic heart and kidney exhibit increased resistance to lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1047: 63-69, 1990
 - 35) Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free radical Biol Med* 5: 113-124, 1988
 - 36) Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39: 1420-1424, 1990
 - 37) Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: The potential role "autoxidative glycosylation" in diabetes mellitus. *Biochem J* 245: 243-250, 1987
 - 38) Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 48(11): 1414-1417, 1999
 - 39) Chugh SN, Kakkar R, Kalra S, Sharma A. Related Articles. An evaluation of oxidative stress in diabetes mellitus during uncontrolled and controlled state and after vitamin E supplementation. *J Assoc Physicians India* 47(4): 380-383, 1999
 - 40) Takasu N, komiya I, Asasa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozotocin and Alloxan induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes* 40: 1141-1145, 1991
 - 41) Matkovic B, Varga S, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm Metab Res* 14: 77-79, 1984
 - 42) Kono Y, Fridovich I. Superoxide radicals inhibit catalase. *J Biol Chem* 257: 5751-5754, 1982
 - 43) Pinkney JH, Downs L, Hopton M, Mackness MI, Bolton CH. Endothelial dysfunction in Type 1 diabetes mellitus: relationship with LDL oxidation and the effects of vitamin E. *Diabet Med* 16(12): 993-999, 1999
 - 44) Tuitok PJ, Ritter SJ, Smith JE, Basu TK. Streptozotocin-induced diabetes lower retinol-binding protein and transthyretin concentrations in rats. *Bri J Nutr* 76: 891-897, 1996
 - 45) Brazy R, Duell PB, Gilmore M, Bierman EL, Chait A. Dietary antioxidants and their effect on LDL oxidation in NIDDM. *Diabetes* 41: 24A, 1992
 - 46) Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and in-

- creased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes* 40(10): 1241-1244, 1991
- 47) Shiro U, Midori HH, Noriko T, Mitsuyoshi M, Masataka S, Hideki I. Vit E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipid S26*: 58-61, 1991
- 48) Asayama K, Nakane T, Uchida N, Hayashibe H, Dobashi K, Nakazawa S. Serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res* 26: 313-315, 1994
- 49) Vannucchi H, Araujo WF, Bernardes MM, Jordao Junior AA. Effect of different vitamin E levels on lipid peroxidation in streptozotocin-diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res* 69(4): 250-254, 1999
- 50) Irritani N, Inoguchi K. Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 618: 378-383, 1990
- 51) Chung JW and Kim SW. Effects of vitamin E and cholesterol feeding on the lipid composition of the plasma lipoproteins. *J Korean Soc Food Nutr* 21(5): 490-495, 1992
- 52) Matz J, Anderson TLG, Ferns GAA, Anggard EE. Dietary vitamin E increases the resistance to lipoprotein oxidation and attenuates endothelial dysfunction in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 110: 241-249, 1994
- 53) Oranje WA, Rondas-Colbers GJ, Swennen GN, Jansen H, Wolffenbuttel BH. Lack of effect on LDL oxidation and antioxidant status after improvement of metabolic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22(12): 2083-2084, 1999