

녹차 Catechin이 당뇨쥐 신장조직의 Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase 및 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향

이 순 재[§] · 최 정 화

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Effects of Green Tea Catechin on the Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Xanthine Oxidase Activities of Kidney in Diabetic Rats

Rhee, Soon Jae[§] · Choi, Jeong Hwa

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Kyungsan 712-702, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of green tea catechins on the antioxidative defense enzyme activity of kidney in diabetic rats. Sprague-Dawley male rats weighing 100 ± 10 g were randomly assigned to one normal and three STZ-induced diabetic groups; catechin free diet(DM-0C group), 0.25% catechin diet(DM-0.25C group) and 0.5% catechin diet(DM-0.5C group). Diabetes was induced by intravenous injection of 55mg/Kg body weight of STZ in sodium citrate buffer(pH 4.3) after 4 weeks feeding of experimental diets. Rats were sacrificed at the 6th day of diabetic states. Superoxide dismutase(SOD) activity in kidney was decreased by 25% and 20% in DM-0C and DM-0.25C groups compared with normal group, DM-0.5C group was not significantly different when compared with normal group. Glutathione peroxidase(GSHpx) activity in kidney was no significant differences the diabetic groups compared to normal group. Xanthin oxidase(XOD) activity was increased by 110% and 63% in DM-0C and DM-0.25C groups compared with normal group, DM-0.5C group was not significantly different when compared with normal group. The contents of superoxide radical(O_2^-) in kidney were 116% and 33%, respectively, higher in DM-0C and DM-0.25C groups than normal group. DM-0.5C group and normal groups were similar levels in their superoxide radical contents of kidneys. Levels of TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) in kidney were increased by 62% in DM-0C group, when compared with normal group, but those of DM-0.5C group were similar to that of normal groups. These results indicate that free radical generation system was weakened and free radical scavenger system was enhance in kidney of STZ-induced diabetics rats by dietary catechin. Thereby it may reduce renal disorders such as oxidative damage and aging of tissue. (*Korean J Nutrition* 34(7) : 734~740, 2001)

KEY WORDS: green tea catechin, kidney, antioxidative defense system, superoxide radical.

서 론

최근 우리나라에서도 당뇨병 환자의 발생율이 증가하는 추세이며 당뇨병 환자에서는 거의 대부분 눈, 신경 및 신장 등의 병변과 심혈관계질환을 동반하고 그 외에도 여러 가지 대사성질환이 초래된다.

당뇨합병증 중에서 혈관성 합병증은 대혈관성 질환과 미

세혈관성 질환으로 대별된다. 그 중 미세혈관 합병증으로는 눈의 망막증이나 신경 및 신증을 들 수 있다. 특히 당뇨병성 신증은 인슐린의존성 당뇨병에서는 40~50%, 인슐린 비의존성 당뇨병에서는 약 10~37%에서 발병하는 중요한 미세혈관성 합병증이다.^{1,2)} 초기변화는 신사구체의 비대, 신사구체 기저막의 비후, 메산지움의 증식을 특징으로 하며³⁾ 이러한 신증의 유발은 신조직에서 혈관의 밀도가 높아 산화적 스트레스에 의한 혈관 손상과 혈관 기능장애와 관련성이 깊다고 볼 수 있다.

생체는 정상적인 생리상태에서는 자유 라디칼의 생성계와 제거계인 항산화 방어계(antioxidant defense system) 사

접수일 : 2001년 4월 12일

채택일 : 2001년 10월 19일

[§]To whom correspondence should be addressed.

이가 균형을 이루고 있다. 그러나 내인적 혹은 외인적 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 자유 라디칼이 과다 생산되거나 혹은 항산화계의 활성이 감소되어 문제가 된다. 특히 당뇨병과 관련하여 산소 자유 라디칼은 만성합병증 발생에 관여하는 주요 기전중의 하나이다.^{1,2)}

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(O₂⁻), hydroxyl radical(OH·) 및 singlet oxygen(¹O₂) 등과 같은 자유 라디칼은 세포에 상해를 주며 특히 세포막의 다불포화지방산에 작용하여 지질과산화물을 생성하고 이로 인해 세포의 기능을 손상시키므로써 조직의 노화와 여러 질병의 발병과 관련이 있다.³⁾

생물학적 반응으로 생성된 free radical을 제거시켜 생체를 보호하는 생리적 항산화 효소로는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSHpx), glutathione S-transferase(GST) 등이 있으며, 저분자로서 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 것으로 tocopherol, β-carotene, ascorbic acid 및 glutathione 등이 알려져 있다.⁴⁾ 그러나 여러 요인에 의해 이러한 항산화계와 같은 유리기 제거계와 생성계의 사이에 그 균형이 깨뜨려졌을때 조직은 과산화적 손상이 초래된다. 그러므로 조직을 과산화로부터 보호하기 위해서는 생체의 항산화 방어계를 강화시켜야 한다.

이러한 연구의 일환으로 최근에는 천연물질을 이용하여 항산화 방어계 강화에 관련된 연구가 진전되고 있고 그 중에서도 특히 기호식품으로 응용되고 있는 녹차에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 지금까지 녹차나 녹차중의 주요성분인 catechin을 이용한 생체 내에서의 항산화기능에 대한 연구가 다소 보고되고 있다.^{5,6)} Catechin의 항산화 작용에 관한 연구로 Isao 등⁷⁾은 catechin류를 쥐에게 장기간 경구 투여한 결과 총 콜레스테롤의 현저한 감소와 함께 혈장에서의 지질과산화물의 증가를 억제시켰다고 보고하였다. 또 Katiyar 등⁸⁾은 catechin의 mouse 피부 표면에서의 항암효과에 대한 연구에서 epicatechin 유도체 즉 epigallocatechin(EGC), epicatechin gallate(ECg), epigallocatechin gallate(EGCg)가 자연적 또는 광자극에 의한 지질과산화에 억제효과를 나타내었다고 보고한 바 있다. 또한 선행연구⁹⁾에서 당뇨쥐 간장에서의 과산화적 손상을 방어하는 녹차 catechin의 효과를 관찰한 바 있다. 이와 같이 녹차 catechin의 생체 내에서의 항산화 작용이 여러 측면으로 입증되어 왔으나 당뇨쥐 신장조직에서 항산화계에 미치는 ca-

techin의 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 항산화적 생리기능이 뛰어나고 또 일부 그 효과가 입증된 녹차 catechin을 대상으로 하여 당뇨 합병증의 예방 및 치료에 관련된 물질개발 연구에 기초연구 자료로써 기여코저 하였다. 따라서 흰쥐를 대상으로 녹차 catechin 수준을 달리한 식이로 일정기간 사육한 후 당뇨를 유발시켜 신장조직에서의 항산화 효소계에 미치는 녹차 catechin의 영향을 규명하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육

실험동물은 체중 100gm 내외의 Sprague-Dawley종 수컷을 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 실험동물의 관리와 이용에 대한 대구가톨릭대학교의 기준에 따라 본 연구를 행하였다. 환경에 적응시키기 위해 일주일간 예비사육한 후, 난괴법에 의해 정상군과 실험군을 나누고, 실험군을 식이내 녹차 catechin의 급여 수준에 따라 catechin을 급여하지 않은 군(DM-0C), catechin을 2.5g/kg diet(DM-0.25C) 공급한 군, catechin을 5g/kg diet(DM-0.5C) 공급한 군 등 각 10마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 실험식은 자유섭식하였다. 사육실의 온도는 22 ± 1.0°C였고, 습도는 50 ± 10%였다. 본 실험은 streptozotocin(STZ) 투여후 6일만에 사육을 종료하였다. 녹차로부터 추출한 식이용 catechin은 Matsuzaki 등⁹⁾의 방법으로 crude catechin 분말을 조제하여 사용하였다. 순도는 68.4%였으며 종류별로 비교하였을 때 EGCg(38.56 ± 0.06) 함량이 가장 높았고 ECG(20.76 ± 0.06), EGC(4.56 ± 0.02), EC(4.52 ± 0.01) 순으로 나왔다.

2. 당뇨 유발

실험동물은 일주일의 예비사육과 식이내 녹차 catechin의 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 300mg/dl 이상인 동물만 희생하여 본 실험에 사용하였다.

3. 사료섭취량, 체중증가량 및 식이효율

Applegate 등¹⁰⁾의 방법에 따라 사료와 식수 섭취량 및 체중은 전 실험기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 전 체중 증가량을 같은 기간동안의 사료섭취량으로 나누어줌으로써 계산하였다.

즉,

$$\text{식이 효율} = \frac{\text{전 체중증가량(g)}}{\text{전 사료섭취량(g)}} \times 100$$

4. 장기채취

실험 종료 후 실험동물을 가벼운 ether 마취하에서 신장을 적출하여 생리 식염수로 씻어내고 무게를 측정 후 액체 질소로 급속 동결시켜 -80°C 에 보관하였다.

5. 신장조직중의 항산화 효소계 활성 측정

1) 분석 시료의 전 처리

채취한 신장조직을 0.9% NaCl로 세척한 후 액체질소로 급속 냉동시킨 후 -80°C 에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다. 신장조직을 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose/0.5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)/5mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES) 용액으로서 10%(w/v) 마쇄액을 만들어서 Park의 방법¹¹⁾에 따라 전처리하였다.

Table 1. Composition of basal diet

Ingredients	Amount(g/kg diet)
Corn starch ¹⁾	668
Casein ²⁾	180
DL-methionine ³⁾	2
Corn oil ⁴⁾	50
Salt mixture ⁵⁾	40
Vitamin mixture ⁶⁾	10
Cellulose ⁷⁾	50
kcal/kg	3850

1) Pung Jin Chem. Co., Seoul, Korea

2) Lactic Casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wington, N. Z.

3) Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri, U.S.A

4) Dong Bang Oil Co., Seoul, Korea

5) AIN-76 salt mixture(g/kg mixture): Calcium phosphate, dibasic ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)500, Sodium chloride(NaCl)74, Potassium citrate-minohydrate($\text{K}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)220, Potassium sulfate(K_2SO_4)52, Magnesium oxide(MgO)24, Manganous carbonate(45-48% Mn)3.5, Ferric citrate(16-17% Fe)6, Zinc carbonate(70% ZnO)1.6 Cupric carbonate(53-55% Cu)0.3, Potassium iodate(KIO_3)0.01, Sodium selenite($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)0.01, Chromium potassium sulfate($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)0.55, Sucrose finely powdered, to make 1,000

6) AIN-76 vitamin mixture(mg/kg mixture): Thiamin · HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine · HCl 700, Nicotinic acid(nicotinamide in equivalent)3,000, D-calcium pantothenate 1,600, folic acid 200, D-biotin 20, Cyanocobalamin(Vitamin B_{12}) 1, Retinyl palmitate or acetate(Vitamin A) as stabilized powder to provide 400,000IU vitamin A activity or 120,000 retinol equivalent, DL- α -tocopheryl acetate 5,000IU, Cholecalciferol(100,000IU, may be in powder form)2.5, Menaquinone(Vitamin K, Menadione)5, Sucrose finely powdered, to, make 1,000

7) Sigma Chem. Co. CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber), St. Louis, Missouri, U.S.A

2) Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund and Marklund¹²⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 tris-HCl buffer(50mM Tris/10mM EDTA, pH 8.5) 1.5 ml에 효소용액 0.1ml를 넣고 7.2mM pyrogallol 0.1ml를 가함으로서 반응을 시작시킨 다음 25°C 에서 정확히 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.05ml를 가해 반응을 정지시켜 산화된 pyrogallol의 흡광도를 420nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

3) Glutathione peroxidase(GSHpx) 활성 측정

GSHpx 활성은 Lawrence 및 Burk의 방법¹³⁾에 따라 측정하였다. 즉 1mM의 EDTA를 함유하는 pH 7.0의 0.1M potassium phosphate buffer 1.72ml에 효소용액 0.05ml와 0.2mM NADPH 0.3ml, glutathione reductase 100unit, 1mM sodium azide 0.3ml 및 1mM 환원형 glutathione (GSH) 용액 0.3ml를 넣고 0.25mM H_2O_2 용액 0.3ml를 가함으로서 반응을 시작시켜 340nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위를 1분간 1 μmol 의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

4) Xanthine oxidase(XOD) 활성 측정

신장조직의 XOD활성도 측정은 xanthine을 기질로 하여 30°C 에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 파장 292nm에서 흡광도를 측정하는 Stipe와 Della Corte의 방법¹⁴⁾을 이용하였다.

5) 신장조직중의 superoxide radical(O_2^-) 측정

(1) 시료의 전처리

신장조직의 mitochondria 분획은 Haper의 변형된 방법¹⁵⁾에 따라 완충용액(1.15% KCl/10mM phosphate buffer/5mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 균질화한 다음 $700 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 $9,000 \times \text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 분리한다. 이때 생긴 pellet 층에 완충용액을 2ml 부유시킨 후 1ml씩 나누어서 -80°C 에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

(2) Superoxide radical 생성량 관찰

Superoxide radical 함량 측정은 Azzi 등¹⁶⁾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 반응액

이 3.0ml가 되게 하였다. 이 반응액을 37℃에서 2분간 반응시키면서 550nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 superoxide radical의 함량을 산정하였다. Superoxide radical 함량은 1mg의 단백질이 1분간 생성시킨 reduced cytochrome c의 양을 nmole로 나타내었다.

6) TBARS 함량

과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 물질(TBARS)를 측정하는 Satoh 방법¹⁷⁾을 이용하였다.

7) 단백질 함량 측정

간장조직 microsome의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하였으며 Lowry방법¹⁸⁾에 의해 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균 차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA 검증)을 수행하였으며, 분산분석의 결과 유의성이 발견된 경우 식이군간의 유의도는 Tukey's-HSD test¹⁹⁾에 의해 분석하였다.

결 과

1. 체중 증가, 식이 섭취량, 식이 효율 및 신장의 무게

실험 기간동안 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이 효율을 관찰한 결과(Table 2) STZ를 투여하기 전까지는 정상군과 각 실험군간의 유의적인 차이는 없었으나 STZ를 투여한 후에는 당뇨유발군 모두에서 식이 섭취량은 증가했지만 체중 및 식이효율은 현저하게 감소하였으며 실험군간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 신장의 무게는 정상군에 비해 당뇨군에서 증가되었으며 실험군간의 유의적인 차이

는 없었다.

2. 신장조직중의 항산화계 관련지표

1) Superoxide dismutase(SOD)

생체내의 항산화 방어기구 중 효소적 방어계의 하나로서 superoxide radical를 환원시켜 H₂O₂로 전환시키므로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 SOD의 활성은 Table 3과 같다. 정상군에 비해 DM-0C군과 DM-0.25C군에서 25%, 20%씩 각각 유의적으로 낮았지만 catechin을 0.5% 공급한 DM-0.5C군에서는 DM-0C군에 비해 32% 유의적으로 증가하여 정상군 수준으로 회복되었다.

2) Glutathione peroxidase(GSHpx)

Selenium을 함유하는 항산화 효소로 비타민 E와 함께 과산화물을 제거하므로써 세포막의 손상을 방지하는 GSHpx의 활성을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 정상군과 당뇨군간의 유의적인 차이는 없었다.

3) Xanthine oxidase(XOD)

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소 즉, free radical 생성계 효소로 알려진 XOD의 활성을 신장조직에서 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 정상군에 비해 DM-0C군과 DM-0.25C군은 각각 그 활성이 110%, 63%씩 유의적으로 증가하였고 0.5% catechin 투여군인 DM-0.5C군은 정상군과 유의적인 차이가 없었다.

3. 신장조직중의 superoxide radical 함량

신장조직중의 superoxide radical(O₂⁻) 함량은 Fig. 1에서와 같이 정상군에 비해 당뇨 유발군에서 O₂⁻ 생성이 증가한 것으로 나타났으며 특히 catechin을 보충하지 않은 DM-0C군에서 이러한 현상이 더욱 현저해져 정상군에 비

Table 2. Food intake, weight gain, kidney weight and food efficiency ratio(FER) of experimental rats

Groups	Body weight gains	Food intake	FER	Liver weight
	(g)	(g)		(g/100g body wt)
During 4 weeks before STZ injection				
Normal	157 ± 6.0 ^{1)NS,2)}	571 ± 18.4 ^{NS}	0.26 ± 0.01 ^{NS}	
DM-0 ^C	155 ± 7.8	563 ± 10.2	0.34 ± 0.09	
DM-0.25 ^C	149 ± 6.1	540 ± 15.6	0.30 ± 0.05	
DM-0.5 ^C	146 ± 5.7	522 ± 8.9	0.38 ± 0.17	
During 6 days after STZ injection				
Normal	23.6 ± 12.0 ^a	105 ± 6.7 ^a	0.22 ± 0.22 ^a	0.702 ± 0.03 ^a
DM-0 ^C	-65.1 ± 18.8 ^b	170 ± 12.6 ^b	-0.79 ± 0.14 ^b	1.063 ± 0.04 ^b
DM-0.25 ^C	-49.6 ± 20.3 ^b	107 ± 10.6 ^b	-0.39 ± 0.17 ^b	0.963 ± 0.04 ^b
DM-0.5 ^C	-64.9 ± 24.6 ^b	120 ± 11.9 ^b	-0.36 ± 0.19 ^b	0.962 ± 0.03 ^b

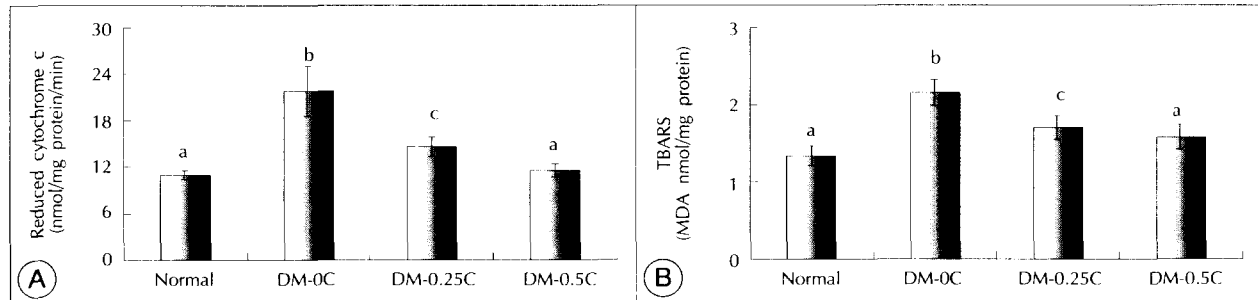
1) All values are mean ± SE(n = 10)

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

Table 3. Effects of green tea catechin supplement on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity of kidney in STZ-induced diabetic rats

Group	SOD (unit/mg protein)	GSHpx (nmol NADPH/mg protein/min)	XOD (nmol/mg protein/min)
Normal	2.365 ± 0.179 ^{1),a,2)}	70.99 ± 7.58 ^{N5}	1.201 ± 0.189 ^a
DM-0C	1.942 ± 0.108 ^b	69.97 ± 7.69	2.527 ± 0.373 ^b
DM-0.25C	2.060 ± 0.111 ^b	74.19 ± 7.68	1.958 ± 0.122 ^b
DM-0.5C	2.571 ± 0.146 ^a	73.88 ± 8.45	1.635 ± 0.189 ^a

1) All values are mean ± SE(n = 10)

2) Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's-HSD test**Fig. 1.** Effects of green tea catechin supplement on superoxide radical(A) and TBARS(B) content in kidney of STZ-induced diabetic rats. Mean ± SE. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's-HSD test. Experimental conditions were same as given in Table 1.

해 116%의 O_2 증가되었고 DM-0.25C군은 33% 증가되었다. 또 DM-0.25C군과 DM-0.5C군은 DM-0C군에 비해 29%, 50%씩 각각 감소하였고, catechin 급여 수준이 높은 DM-0.5C군의 O_2 생성 수준은 정상군과 유사하였다.

4. 신장조직의 TBARS 함량 변화

생체조직의 과산화적 손상의 지표로서 성인병 및 발암의 요인물질로 알려진 지질과산화물을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 정상군에 비해 DM-0C군은 62% 증가하였고 catechin을 투여한 DM-0.25C군과 DM-0.5C군은 DM-0C군에 비해 각각 21%, 27%씩 감소하였으며 DM-0.5C군은 정상군 수준으로 회복되었다.

고 찰

본 연구는 STZ으로 유발시킨 당뇨병 신장조직에서의 free radical 생성계와 제거계 효소들의 활성 변화에 따른 조직의 과산화적 손상 정도와 활성산소종을 관찰하여 녹차 catechin의 당뇨 신장조직에서의 항산화 기능을 규명하는데 목적이 있었다.

본 실험에서 체중 증가량을 관찰한 결과 STZ 주사 후 식이섭취량은 증가되었지만 체중증가 및 식이효율은 현저한 감소를 보였으며 이는 많은 당뇨병 실험^{20,21)}에서 보고된 바와 같은 결과였다. 신장의 무게는 정상군에 비해 당뇨병군에

서 증가되었으며 실험군간의 유의적인 차이는 없었다. 이와 같이 당뇨병 초기에 급속한 신장비대가 있었던 것은 Flyvbjergem²²⁾의 보고와 일치하였다.

생체내에서 생성된 superoxide radical(O_2^-)과 같은 자유 라디칼은 superoxide dismutase(SOD)에 의해 과산화수소로 전환되고 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase(GSHpx)에 의해서 무독한 H_2O 로 전환되며, 이 과정에서 세포는 산소독으로부터 보호된다.

본 연구에서 GSHpx활성은 정상군과 당뇨병군간의 유의적인 차이가 없었다. 그러나 SOD 활성은 정상군에 비해 DM-0C군과 DM-0.25C군에서 25%, 20%씩 각각 유의적으로 낮았지만 catechin을 0.5%공급한 DM-0.5C군에서는 DM-0C군에 비해 32% 유의적으로 증가하여 정상군 수준으로 회복되었다. 이러한 결과는 STZ 유발 당뇨병의 간조직에서 항산화 효소 활성을 관찰한 Park⁸⁾의 결과에서 catechin이 항산화 효소 활성을 증가시켰다는 결과와 일치한다. 또한 L'abbe와 Trick²³⁾과 Saito 등²⁴⁾의 연구에서 flavonoid들의 항산화적 기능이 주로 superoxide anions의 제거를 통해 그 영향을 미치는데 catechin이 이러한 강한 항산화력을 가지고 있다는 보고와 일치한다.

생체내 유리기 생성계의 하나인 XOD는 purine, pyrimidine, pteridine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체내에는 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xan-

thine으로, xanthine을 다시 산화시켜 요산을 생성하는 반응의 촉매로 작용한다.²⁶⁾ XOD의 활성을 신장조직에서 관찰한 결과는 정상군에 비해 DM-0C군과 DM-0.25C군은 각각 그 활성이 110%, 63%씩 유의적으로 증가하였고 0.5% catechin 투여군인 DM-0.5C군은 정상군에 비해 36% 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다.

이러한 결과는 STZ 유발 당뇨병 간조직에서 xanthine의 산화가 증가되어 XOD 활성이 증가한다는 Urano 등²⁶⁾의 간조직에서 XOD활성이 증가되었다는 결과와 같이 신장조직에서의 경향도 비슷하였다. 또 Cho 등²⁷⁾의 연구결과에서 차에서 추출한 catechin 급여로 간조직에서 XOD의 활성이 저하되었는데 이는 본 실험의 신장에서의 결과와 일치하였다. 따라서 STZ유발 당뇨병에서 XOD 활성이 증가됨으로써 이때 superoxide radical 생성이 증가되어 지질과산화가 촉진되는 것으로 생각되며 이러한 결과로 미루어 보아 XOD의 활성 증가가 산화적 손상의 요인중의 하나로 작용했다고 볼 수 있으며 catechin 투여는 XOD 활성을 저해하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

또한 본 실험에서 자유 라디칼중 대표적인 superoxide radical(O₂⁻) 생성을 측정할 결과 정상군에 비해 당뇨병은 116%의 O₂⁻ 증가되었고 DM-0.25C군은 33% 증가되었다. 또 DM-0.25C군과 DM-0.5C군은 DM-0C군에 비해 29%, 50%씩 각각 감소하였고, catechin 급여 수준이 높은 DM-0.5C군의 O₂⁻ 생성 수준은 정상군과 유사하였다.

생체내의 활성산소의 연쇄반응의 결과로 생성되는 지질과산화물은 STZ 유발 당뇨병중 catechin을 투여 하지 않은 DM-0C군이 정상군에 비해 62% 높았으나 catechin을 투여한 군들은 DM-0C군에 비해서는 유의적으로 감소하였다. 이러한 신장조직에서의 과산화물가의 감소는 catechin이 생체내에서 지질과산화물 생성을 촉진시키는 물질인 free radical을 제거하는 기능을 가진 항산화 방어계를 활성화시킴으로써 과산화물의 생성이 억제됨을 의미하는 것으로 볼 수 있고 이러한 결과는 Kwon 등²⁸⁾이 catechin을 투여한 후 간장, 지방조직에서의 지질 과산화물 축적이 감소된 결과와 일치하였다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 catechin이 free radical 생성체인 XOD 활성을 억제시키고 제거체인 SOD활성을 증가시킴으로써 superoxide radical 생성을 억제시키고 지질과산화물의 생성을 억제시킴으로 신장조직의 손상을 막을 수 있다고 볼 수 있다.

이와 같이 catechin은 당뇨병 신장조직에서의 항산화 작용이 뚜렷함이 관찰되었으므로 당뇨병환자에서 동반되는 신

장질환 및 노화 방지를 위한 우수한 기능식품으로 이용될 수 있을 것으로 믿는다.

요약 및 결론

당뇨쥐 신장조직에서의 항산화계의 활성변화 및 활성산소종 생성과 지질과산화를 관찰하고 이에 미치는 catechin의 영향을 관찰코저 정상군과 당뇨병군으로 나누고 당뇨병군은 다시 식이내 catechin 함량에 따라 각각 0% catechin(DM-0C군), 0.25% catechin(DM-0.25C군), 0.5% catechin(DM-0.5C군) 식이로 흰쥐를 4주간 사육하여 STZ으로 당뇨병을 유발하고 6일째에 희생하였다.

체중 증가량을 관찰한 결과 STZ 주사 후 식이섭취량은 증가되었지만 체중증가 및 식이효율은 현저한 감소를 보였으며 신장의 무게는 정상군에 비해 당뇨병군에서 증가되었으며 실험군간의 유의적인 차이는 없었다.

신장조직 중의 SOD 활성은 정상군에 비해 DM-0C, DM-0.25C에서 각각 25%, 20%씩 감소하였고 DM-0.5C군은 정상군 수준이었다. GSH-px 활성은 정상군과 당뇨병간의 유의적인 차이가 없었다.

또 신장조직 중의 XOD 활성은 정상군에 비해 DM-0C군과 DM-0.25C군이 각각 110%, 63%씩 증가하였고 DM-0.5C군에서는 정상군과 비슷한 수준이었다.

신장조직중의 superoxide radical(O₂⁻) 생성량을 관찰한 결과 정상군에 비해 DM-0C군, DM-0.25C군에서 116%, 33%씩 각각 증가되었으나 DM-0.5C군은 정상군 수준이었다. 조직중의 지질과산화물가는 정상군에 비해 당뇨병군이 62% 증가하였으나 0.5% catechin투여군인 DM-0.5C군은 정상군 수준이었다.

이상과 같이 STZ 유발 당뇨병 신장조직은 당뇨 유발로 인하여 항산화계 불균형이 발생하고 조직의 지질과산화물과 활성산소종의 생성이 증가되었다. 그러나 식이내 녹차 catechin의 급여는 생체내 항산화방어기구인 SOD 활성을 증가시켜 산화적 스트레스로 인해 생성된 superoxide radical 생성을 현저하게 감소시켰다. 결론적으로 녹차 catechin은 다른조직에서와 같이 신장조직에서도 chain-breaking antioxidant 역할로서 항산화계를 강화시키는 기능이 규명되었다.

■ 감사의 글

이 논문은 2000년 보건복지부에서 시행한 보건의료기술 연구개발사업(HMP-00-B-22000-0151) 연구비 지원에 의해 수행된 연구과제입니다.

Literature cited

- 1) Choi YK, Lee TH. Diabetics and hyperlipidemia, Medical press, Seoul Korea, pp111-113, 1995
- 2) Pedro C, Francis D, Jose G, Nathan W. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozotocin-induced diabetic in rats. *Diabetes* 76: 80-87, 1987
- 3) Vibert GC, Wiseman MJ. The kidney in diabetes: significance of the early abnormalities. *Clin Endocrinol Metab* 15: 753-782, 1986
- 4) Bruce AF, James D, Carpo MD. Biology of Disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426, 1982
- 5) Borrello S, Seccia A, Galleotti T, Bartoli GM, Farallo E, Serri F. Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Arch Dermatol Res* 276: 338-340, 1984
- 6) Iso T, Yoshiyuki N, Mitsuaki S, Junichi W, Shinji M, Naho S, Kyoji Y. Preventive effects of green tea against oxidative damage and mutagenesis. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Green Tea* 1: 69-73, 1993
- 7) Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Inhibition of spontaneous and photo-enhanced lipid peroxidation in mouse epidermal microsomes by epicatechin derivatives from green tea. 1: 74-77, 1993
- 8) Park GY, Rhee SJ, In JG. Effects of green tea catechin on cytochrome P₄₅₀, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26(5): 901-907, 1997
- 9) Matsuzaki T, Hata Y. Antioxidative activity of tea leaf catechin. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 59: 129-134, 1985
- 10) Applegate EA, Uptar DE, Stern JS. Exercise and detrains. Effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-mendel rats made obese by a high fat diet. *J Nutr* 114: 447-459, 1984
- 11) Park MH. Effects of dietary selenium on peroxidative damage and antioxidative system in brain of cadmium administered rats. *Kor J Gerontol* 14-19, 1994
- 12) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474, 1974
- 13) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958, 1976
- 14) Stripe F, Della Corte E. The Regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244(14): 3855-3863, 1969
- 15) Haper MJK, Catherine J, Norris WE, Friedrichs MA. Poly I: C accelerates ovum transport in the rabbit by a prostaglandin-mediated mechanism. *J Reprod Fert* 63: 81-89, 1981
- 16) Azzi 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: 597-603, 1975
- 17) Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chemica Acta* 90: 37-43, 1978
- 18) Lowry OH, Rosenbrouth NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 19) Chai SE, Kim BR. Statistic analysis used spss/pc, Bummun Co., 1988
- 20) Craft NE, Failla ML. Zinc, iron and copper in the streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 244: 122-128, 1983
- 21) Failla ML, Kiser RA. Hepatic and renal metabolism of copper and zinc in the diabetic rat. *Am J Physiol* 244: 115-121, 1983
- 22) Flyvbjerg A, Thorlacius, Ussing O, Naera R. Kidney tissue somatomedine-C and initial renal growth in diabetic rats. *Diabetologia* 31: 310-314, 1988
- 23) L'abbe M, Trick KO. Changes in pancreatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in the prediabetic diabetic-prone rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 207(2): 206-212, 1994
- 24) Saito, Yamanaka N, Yamanaka H, Nagasawa S. Glutathione-related detoxication functions in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Vet Med Sci* 55(6): 991-994, 1993
- 25) Duke Ej, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *J Biochem* 131: 187, 1973
- 26) Urano S, Midori HH, Tochihi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26(1): 58-61, 1991
- 27) Cho YJ, Chun SS, Rhee CO. Inhibitory effect of condensed tannins isolated from Korean green tea against xanthine oxidase. *J Food Sci Nutr* 22(4): 418-422, 1993
- 28) Kwon MN, Choi JS, Byun DS. Effect of flavonoid(+)-catechin as stabilizer in rat fed fresh and peroxidized fish oil. *J Food Sci Nutr* 22(4): 381-391, 1993