

감마선 전신 조사와 치커리 가공물 식이가 Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 산화적 손상과 지질대사에 미치는 영향

우현정 · 김지향 · 김진규* · 김희정¹ · 박기범¹

한국원자력연구소 정읍분소 방사선연구원, ¹경원 시너지 (주)

Effect of Gamma Irradiation and *Cichorium* Products on Oxidative Damage and Lipid Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Hyun Jung Woo, Ji Hyang Kim, Jin Kyu Kim*, Hee Jung Kim¹ and Ki Beom Park¹

Korea Atomic Energy Research Institute ARTIJ, Jeongeup 580-185, Korea

¹Kyung Won Synergy Co., Daejeon 305-353, Korea

Abstract - The increased occurrence of hyperglycemia and oxidative stress in streptozotocin (STZ) induced type I diabetes has been implicated in the etiology and pathology of disease complication. STZ has known to be genotoxic in a variety of assays including tests for microbial mutagenesis and unscheduled DNA synthesis in rat kidney. Diabetes mellitus (DM) is a pathologic condition, resulting in severe metabolic imbalances and non-physiologic changes in many tissues. We examined the effect of gamma radiation and KWNP on preventing the development of insulin dependent diabetes mellitus using streptozotocin-induced Fisher 344 diabetic rats. The hematological values (red blood cell and white blood cell), serum biochemical constituents-alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol, triglycerides and insulin-were checked and the organs (testis, spleen and kidney) were weighed. The gonad indices of the STZ treated groups were much lower than the value of the control group. But the gonad indices of the KWNP treated groups were higher than those of the treated groups. The ratio of the weight of kidney to the body weight of the STZ treated groups was higher than that of the control group. The value of the diabetic group treated with KWNP after irradiation (F group) was lower than the other STZ treated groups. The white blood cell and ALP values of the F group were lower than the other STZ groups, as well. The cholesterol and triglyceride values of all the KWNP treated groups were significantly lower than the other groups. A significant increase (about 10 times) of insulin was detected in the F group. The results of hematological assay showed the distinctive damage in the irradiated and STZ treated groups. The quantity of apoptotic cells in seminiferous tubule of testis confirmed a serious damage as assessed in the STZ treated groups. These experimental results have revealed that treatment of the products of KWNP after irradiation has the antidiabetic effect in the STZ-induced diabetic rats. But the F group showed higher recuperative power. These experimental results have revealed that treatment of the gamma irradiation and KWNP have the recovering effect in the STZ-induced diabetic rats.

Key words : streptozotocin, diabetic rat, gamma irradiation, KWNP

* Corresponding author: Jin Kyu Kim, Tel. 063-570-3130,
Fax. 063-570-3139, E-mail. jkkim@kaeri.re.kr

서 론

당뇨병은 췌장의 랑게르한스섬 β 세포의 인슐린 분비 장애와 인슐린에 대한 말초조직 저항성에 의해 유발되며 고혈당이 특징적으로 나타난다. 당뇨병의 대표적인 증상으로는 다뇨(多尿), 다식(多食), 다음(多飲)이 있으며 만성적 피로가 동반된다. 다뇨는 인슐린의 양이 부족하거나 작용이 저조한 경우 혈당 수치가 170 mg dL^{-1} 을 넘게 되면 여분의 당을 배설하기 위해 배뇨의 횟수 및 양이 증가하는 것이며, 증가된 뇨량의 수분을 공급하기 위하여 다음현상이 나타나게 된다. 또한 혈당이 세포 내로 들어가지 못해 영양공급이 원활히 이루어지지 않아 다식 현상이 일어나게 된다. 당뇨병은 여러 가지 합병증-시력장애, 백내장, 신부전, 동맥 경화, 뇌졸중, 심근경색-의 발병률을 높이는 것으로 알려져 있으며, 이러한 합병증의 발생 증가는 산화적 스트레스와 밀접한 연관이 있는 것으로 보고 되고 있다. Wada(1983) 등은 당뇨쥐에서 과산화적 손상에 의해 지질 과산화물의 축적이 증가되고 혈청 중 중성지질 수준이 증가된다고 보고하였으며, Morel(1989) 등은 STZ 유발 당뇨쥐에서 지질과 산화물이 증가되고 혈장 지단백 중 VLDL과 LDL의 산화가 촉진되어 세포독성이 나타났다고 보고하였다.

치료와 예방을 위해 많은 투자와 신약의 개발이 있었음에도 불구하고 지난 십년동안 당뇨병은 급격히 증가하였는데 실제로 미국에서는 부적당한 생활과 비만의 증가와 연결되어 당뇨병 발병률이 33% 증가하였다. 우리나라의 경우도 인구의 고령화 및 급속한 식생활의 서구화, 생활양식의 변화로 당뇨병 환자가 급격히 늘어난 추세이다. 이러한 당뇨병은 치료하기 난해한 질병 중 하나로 치료 의약품과 함께 식이요법, 식품 첨가제 및 약초를 포함하는 대체 요법 사용이 많이 이루어지고 있다. 특히 치커리의 뿌리에 많이 포함된 것으로 알려진 이눌린과 fructan류들은 장내 미생물에 의해 발효되는 과정에서 단쇄지방산을 생성하고 생성된 단쇄지방산은 여러 대사경로를 통해 혈당 및 혈중 지질에 유익한 영향을 미치며 수용성 식이섬유, 당알콜, 저항성전분과 유사한 대사과정을 겪는 것으로 알려져 있다(Roberfroid *et al.* 1993). Roberfroid 등(1998)은 치커리 이눌린과 치커리 프락토올리고당에 의한 장내미생물의 bifidogenic 효과를 연구하였고, Levrat 등(1991)은 치커리 이눌린의 장내 미네랄 흡수 촉진 효과와 치커리 물 추출물이 장내 유익균인 *Bifidobacteria*와 *Lactobacilli*의 생육을 유의적으로 크게 증가시켜 장내 균종의 조성을 유익한 방향으로 개선시킨다고 보고하였다. 이눌린의 중합도는 3부터

100까지 다양하고, 중합도 2 이상 20 이하인 이눌린을 프락토올리고당이라고 정의하고 있다. 프락토올리고당은 생체 내의 소화효소에 의해 가수분해 되지 않는 난소화 성당이며, *Bifidobacteria*, *Bacteroides fragilis group*, *peptostreptococcus* 및 *Klebsiella* 등과 같은 장내세균에 의해서는 이용되지만 *Clostridium perfringens*, *Escherichia* 등의 장내 유해세균에 의해서는 잘 이용되지 못한다. 프락토올리고당은 특히 *Bifidobacteria*가 선택적으로 이용할 수 있는 올리고당으로 알려져 있다. 고콜레스테롤 식이에 비피더스균을 섭취시켰을 경우 혈장 중 콜레스테롤의 농도가 크게 낮아지는 결과가 보고되어 혈청 내 콜레스테롤의 농도를 감소시키는 유익한 작용이 있는 것으로 검증되고 있다(Homma 1988). 또한 비소화성 다당류는 식이에 대한 혈당 및 인슐린 반응을 감소시키고, 식이섬유는 전분의 흡수를 감소시킴으로서 당뇨병환자의 치료에 유용한 것으로 알려져 있다.

또한 이온화 방사선인 γ 선을 조사하면 당뇨쥐에 있어서 내생 항산화물질을 증가시켜 췌장의 랑게르한스섬의 β 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다(Takaharu and Kazuo 2005). 때문에 이온화 방사선을 조사할 경우, 조사하지 않은 당뇨쥐에 비하여 더 많은 인슐린이 분비되었으며 이로 인해 혈당도 낮아진다.

본 연구에서는 당뇨에 효과가 있는 것으로 알려진 두 가지 요소인 치커리를 가공한 KWNP와 이온화 방사선의 조사를 복합 처리하여 생체 기능 활성화 현상 및 특정 손상에 대한 회복 및 예방 효과에 대한 생물학적 검증과 함께 그 효과에 대해 과학적으로 접근하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용된 치커리 가공물(KWNP)은 경원시너지(주)에서 제공받아 사용하였다. Infrared Moisture Determination Balance (A&D company, Limited, Japan)를 이용하여 KWNP의 수분 함량을 측정하였다. 추출물의 수분 함량은 $33.2 \pm 6.94\%$ 이었으며, 실험에 사용되기 전까지 4°C 에서 보관하였다.

2. 실험동물 및 처리

실험동물은 생후 5주령의 수컷 F344 흰쥐 (Samtako Bio. Korea)를 사용하였다. 한국 원자력연구소 내의 사육실에서 고형 사료(슈퍼피드 주식회사, Korea)와 물을 충분히 공급한 상태로 10/14시간(명/암)의 조명조건 하에서 1주일간 적응시킨 후에 실험에 사용하였다.

실험 그룹은 평균 체중이 유사하도록 임의로 총 8군으로 나누었고 각 실험군은 3마리가 되게 하여 다음과 같이 분류하였다.

- A : 대조군
- B : 방사선 처리군
- C : KWNP 처리군
- D : 방사선 처리 후 KWNP 처리군
- E : streptozotocin (STZ) 처리군
- F : STZ 처리 후 방사선 처리군
- G : STZ 처리 후 KWNP 처리군
- H : STZ, 방사선 동시 처리 후 KWNP 처리군

STZ 처리군의 경우, streptozotocin (STZ) 50 mg kg⁻¹ B.W.를 1 mL의 0.09 M citrate buffer (pH 4.3)에 녹여 1회 복강 주사하였다. 주사 후, 공복 혈당 농도가 220 mg dL⁻¹ 이상인 동물만을 선별하여 사용하였다. 방사선 처리군의 경우에는 한국원자력 연구소의 감마선 발생장치 (Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)를 이용하여 방사선을 조사하였다 (Kim *et al.* 2003). 조사선량은 선량-반응식을 기준으로 단기간 내에 손상이 확인된 선량을 조사하였으며, ⁶⁰Co 선원의 강도는 약 150 TBq, Fricke dosimeter로 측정된 선량률이 12.82 Gy hour⁻¹가 되게 하여 총 6.5 Gy를 처리하였다 (Lee *et al.* 2000). STZ와 방사선 동시 처리군의 경우, STZ 처리 후 당뇨로 판정된 쥐를 대상으로 방사선을 조사하였다. KWNP 처리군은 음용수에 1 mg L⁻¹의 농도로 KWNP를 희석하여 5주간 처리하였다. 주기별로 체중 측정과 혈당을 측정하였다. 혈당 측정을 위한 혈액의 채취는 꼬리 정맥을 통하여 이루어졌다. 5주간의 처리 후 혈액과 조직을 채취하여 항목별 평가를 수행하였다.

3. 혈액내 주요 인자의 수준 확인

실험동물의 혈액을 채취하여 일반 혈액학 검사를 위해서 항응고제 (EDTA, Sigma, USA)를 처리한 후 red blood cell (RBC)과 white blood cell (WBC) 수준을 각 세포계수기를 이용하여 알아보았다. 혈청 내 생화학적 구성물인 alkaline phosphatase (ALP), lipase, total cholesterol, triglyceride, glucose, insulin의 수준을 확인하였다. 검사는 ALP는 alkaline phosphate reagents (Bayer, USA)를 사용하여 kinetic UV method와 enzymatic method 반응을 통해 ADVIA 1650 (Bayer, Japan)으로 분석하였고, total cholesterol, triglyceride, glucose는 각각 cholesterol reagent (Bayer, USA), triglycerides reagents (Bayer, USA), glucose hexokinase (Bayer, USA)를 사용하여 ADVIA

1650 (Bayer, Japan)으로 분석하였다. Lipase의 경우에는 lipase (Roche, Switzerland)를 사용하여 enzymatic method와 colorimetry method를 통해 cobas integra (Roche, Switzerland)로 분석하였다. Insulin은 rat insulin RIA kit (Linco Research Inc. USA)를 이용하여 γ (gamma)-counter (Packard, USA)로 분석하였다 (Fukuda *et al.* 2004).

4. Hematoxylin-Eosin 염색을 이용한 정소 세포의 손상 파악 및 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling 방법에 의한 주요 기관의 세포자연사 판정

산화적 자극에 민감하게 반응하는 기관인 생식소와 당뇨병에 의해 신장비대가 나타나는 신장의 조직을 관찰하였다. 적출한 정소와 신장은 조직학적 실험을 위해 10% neutral buffered formalin (NBF) 용액을 이용하여 고정하였으며, 30%에서 100% 알코올 과정을 거쳐 탈수하였다. Xylene으로 알코올을 제거한 후 조직을 투명화하여 파라핀 (Paraplast, Oxford)을 침투시켜 포매한 후, 완성된 블록은 박편절단기 (microtome, Leica 820)를 사용하여 5 μ m 절편을 만들어 슬라이드에 도말 건조하였다. 기본적인 형태를 관찰하기 위해 hematoxylin-eosin 염색 후 Canada balsam으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

기관 내 세포자연사를 확인하기 위해 TUNEL 방법에 의한 *in situ* 세포자연사 검진 키트 (ApopTaq, Immunotech)를 사용하였다. 먼저 5 μ m로 절단한 절편에서 xylene으로 파라핀을 제거하고 알코올 과정을 거쳐 흐르는 물에 수세하였다. Proteinase K (20 μ g mL⁻¹)로 30분 동안 37°C에서 단백질을 제거한 다음 흐르는 물에 수세하였다. 세포에 내재하는 내재성 효소를 제거하기 위해 3% H₂O₂로 10분 동안 반응시킨 후 흐르는 물에 5분간 세척하였다. 슬라이드를 인산 완충액 (PBS, pH 7.6)으로 처리 후, ApopTaq kit에 포함되어 있는 평형 완충액으로 10분간 더 처리하였다. 이후 37°C에서 60분간 terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (TdT)을 첨가하여 반응 시켰다. 그 후 반응을 중단하기 위해 반응 정지 완충액으로 상온에서 10분간 처리한 후, PBS로 3회 세척하였다. 그 후 anti-digoxigenin peroxidase로 37°C에서 30분간 처리한 후 다시 PBS로 세척하고 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.1% in PBS)와 0.002% H₂O₂가 포함된 용액으로 10분간 발색시켰다. 발색이 된 조직은 증류수로 세척하고 0.5% methyl green으로 10분간 대조 염색을 시행하였다. 그 후 알코올 처리 및 xylene 처리 후 Permount (Fisher Scientific Co.)로 봉입하였다. 표본들을 광학현미경 (Olympus-BX 50)하에서 400배의 배율로 검정

하여 정소 세정관내 변화를 관찰하였다.

5. 통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과의 통계학적 유의성 검정은 SAS program을 이용하여 분석하였다. 각각의 실험 결과 들은 확인하고자하는 내용에 따라 비교 대상을 바꿔 T-test를 행하였으며, *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하 다고 판정하였다. 반복 실험의 결과는 평균±표준편차평 균(SEM)으로 나타내었다.

결 과

1. 체중 변화 및 기관 무게

STZ 처리, 방사선 전신 조사 및 KWNP 처리 5주후의 체중 증가치를 실험군간 비교하였다. Table 1에서 보여 주듯이 대조군인 A군의 경우 5주 동안의 체중증가율이 177.6±1.80%를 나타낸 반면 방사선 조사군인 B군의 평균 체중(153.3±1.73%)은 약 24.3±0.07% 둔화 되었 고, STZ 처리군인 E군의 평균 체중(105.4±2.31%)은 A 군에 비해 약 73.2±0.51% 둔화되었다. 즉, A군과 비교 하여 B군은 체중증가율이 유사한 반면, E군은 유의적으 로 감소하였다. 또한 STZ 처리군 내에서의 체중증가율 비교 시, STZ 처리만 한 E군에 비하여 방사선을 동시에 처리한 F군(83.2±0.16%)의 경우 22.2±2.15%의 감소 가 관찰되었다. 반면, STZ, 방사선 처리 후 KWNP를 처 리한 H군(143.5±12.23)의 경우에는 E군에 비하여 37.9 ±9.92%의 체중증가율을 보였다(*p*<0.05).

기관 무게 측정은 정소, 신장, 비장을 채취하여 조사하 였으며, 조직 채취 당시의 습무게(wet weights)를 측정하 여 각 개체의 체중(body weights)으로 나눈 후 그 백분 율을 산출하였다(Fig. 1). 정소의 무게를 실험군간 비교 하여 보면 방사선을 전신 조사한 B군(0.154±0.013%) 은 대조군 A군(0.473±0.043%)에 비하여 약 30% 정도 유의(*p*<0.005)하게 감소하였고, KWNP를 처리한 D군(0.247±0.049%)은 B군에 비해 1.6배 증가하였다(*p*<

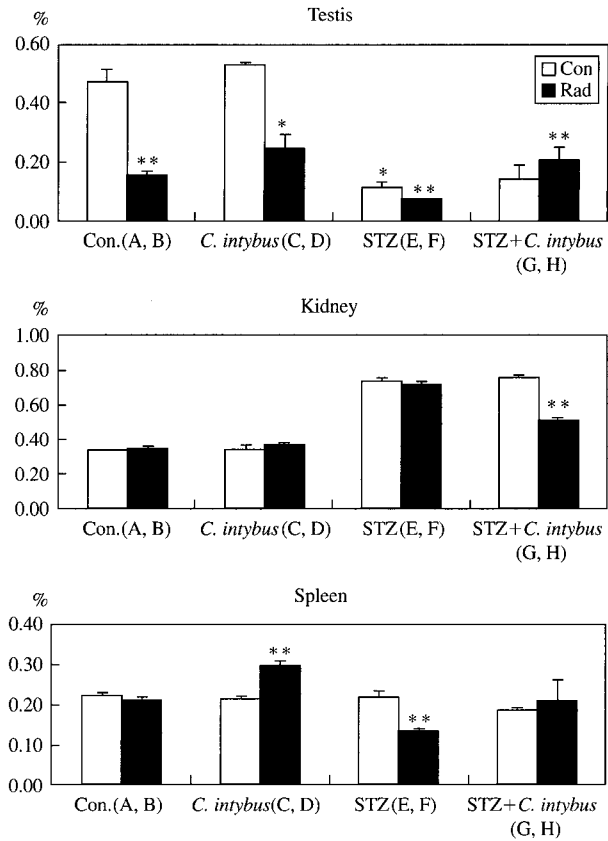


Fig. 1. The organ indices^{II} (testis, kidney and spleen) of the experimental group 5 weeks after treatment.^{II} indicate that values of organ indices are calculated from the equation of organ weight/body weight of each animal. Abbreviations: con, the control group; rad, the wholebody irradiation; STZ, the streptozotocin treated group; *, *p*<0.05; **, *p*<0.005.

0.05). STZ처리군 E군(0.109±0.021%)의 경우 A군에 비하여 약 23%의 현저한 무게 감소를 보였으며 방사선 과 복합 처리한 F군(0.071±0.003%)과 비교하였을 경 우 유사한 감소를 나타냈다. 체중 변화와 마찬가지로 정 소무게에 있어서도 H군(0.205±0.046%)은 E군과 비교 하여 약 1.9배의 유의한 무게 증가를 나타내었다(*p*<0.005).

신장의 경우, A군(0.340±0.002%)과 비교 시 당뇨병군 인 E군은 0.735±0.017%로 약 2배의 무게 증가를 보였 다. 이는 당뇨병에서 흔히 관찰되는 증후로 신사구체의 비대, 신사구체 기저막의 비후 등에 따른 것으로 알려져 있다(Lee and Choi 2001). 또 다른 당뇨병군인 F, G군에서 는 각각 0.726±0.009, 0.746±0.019%로 유의하지 않은 변화를 보여주었으나, STZ, 방사선과 KWNP를 처리한 H군의 경우 0.510±0.019%로 E군과 비교 시 유의한 감 소(*p*<0.005)를 나타내었다.

Table 1. The rate of the increase in the body weight during 5 weeks (%)

	Control	Irradiation
Control	A : 177.6±1.80	B : 153.3±1.73
KWNP	C : 181.6±0.98	D : 127.5±11.86
STZ	E : 105.4±2.31*	F : 83.2±0.16*
STZ+C. intybus	G : 91.0±4.18*	H : 143.5±12.23

The values are mean±SEM (n=5). *, *p*<0.05

방사선에 의한 직접적인 영향이 가장 큰 것으로 알려져 있는 비장의 무게를 실험군간 비교하였다. 방사선을 전신 조사한 B군의 비장무게 ($0.209 \pm 0.010\%$)는 대조군 A군의 것 ($0.221 \pm 0.007\%$)과 비교하였을 때 5%의 무게 감소를 보여 유사한 결과를 나타냈다. KWNP 처리군인 C군, 당뇨군 E, G, H군도 각각 0.213 ± 0.005 , 0.219 ± 0.014 , 0.185 ± 0.007 , $0.206 \pm 0.055\%$ 로 유의하지 않은 변화를 나타내었다. 반면 방사선과 KWNP 처리군인 D군은 비장의 무게비율이 $0.296 \pm 0.012\%$ 로 A군에 비하여 약 1.3배 증가하였으며, STZ와 방사선을 처리한 F군은 $0.137 \pm 0.002\%$ 로 약 44% 정도의 감소를 보였다.

2. 혈장 포도당의 변화

실험 기간 중 채혈하여 공복 시 혈장 중의 포도당 수준을 분석하였다(Fig. 2). 실험기간동안 정상군에 비하여 당뇨군의 혈당이 유의적으로 높았으며 ($p < 0.005$) 당뇨군 사이에서의 특별한 유의성은 나타나지 않았다. 단 STZ 처리 후 1주차에서 방사선을 처리한 실험군 F군에서 유의하게 낮아졌으나 2, 3주차에 급격히 상승되는 양

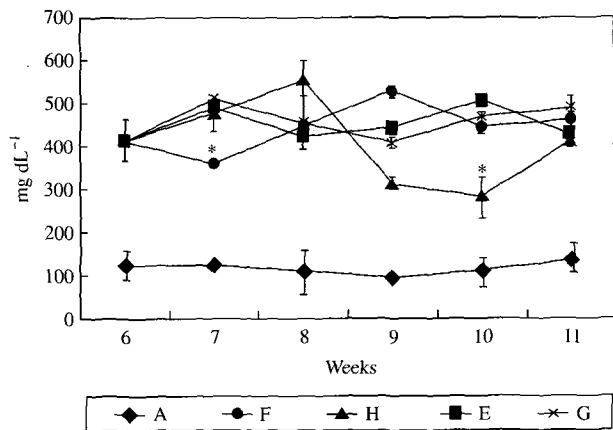


Fig. 2. The effect of KWNP on the blood glucose values. The description of the experimental groups in this studies was summarized at 'Materials and Method'; *, $p < 0.05$.

상을 보였으며, 3주차부터 떨어지기 시작한 H군의 혈당이 4주차에서 E군과 비교시 유의하게 떨어졌다. 하지만 실험 마지막 주인 5주차에서 혈당은 유의한 차이를 보이지 않았다.

3. 혈액 내 지표 인자의 변화

전신 방사선 조사와 STZ 처리가 신체 내에 미치는 손상 여부와 KWNP의 회복 능력을 알아보기 위하여 혈액 내 지표 인자의 변화를 살펴보았다. 우선 혈액 내의 적혈구와 백혈구의 수치를 계수하여 대조군인 A군을 100으로 하였을 경우의 그 비율을 산출하였다. 적혈구의 이상 증가는 진성다혈증, 탈수, 충격, 부신부전증 등을 나타내며 이상 감소는 각종 빈혈, 수혈증 등을 나타낸다. A군($100 \pm 0.46\%$)의 적혈구 수치에 비하여 모든 처리군에서 전반적으로 낮은 적혈구 수치를 나타냈으며 특히 감마선과 KWNP를 처리한 D군($77.8 \pm 8.09\%$)에서 유의하게 낮은 수치를 나타내었다. 백혈구의 경우 적혈구에 비하여 그 차이가 확연하게 나타났는데 A군의 백혈구 수치가 $100 \pm 0.85\%$ 에 비해 방사선 조사군인 B군은 $43.7 \pm 11.69\%$, 방사선 조사 후 KWNP 처리군은 D군은 이보다 약간 높아진 $53.8 \pm 1.02\%$ 의 수치를 나타내었다. 방사선과 STZ를 복합 처리한 F군($12.2 \pm 3.73\%$)에서 가장 낮은 백혈구 수치가 나타났고, 이러한 낮은 백혈구 수치는 재생불량성 빈혈, 과립구감소증, 악성빈혈 등에서 관찰될 수 있는 결과이다. 간질환, 간경변, 폐쇄성 황달, 골질환, 장질환, 암증을 알아볼 수 있는 alkaline phosphatase (ALP)의 측정 결과, D군($83.3 \pm 13.83\%$)은 A군($100 \pm 1.19\%$)과 비교하여 유사한 수치를 나타냈으나 STZ를 처리한 모든 군에서는 그 수치가 현저하게 높아짐을 확인할 수 있었다. E($431.8 \pm 36.01\%$), F($428.8 \pm 40.30\%$), G($464.9 \pm 33.63\%$), H($241.8 \pm 50.23\%$)군 모두 약 2~4배가 넘는 증가를 보였으며, 당뇨군 사이에 유의성을 검토한 결과 H군에서 유의하게 ALP 수치의 감소를 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

당뇨병의 합병증으로 나타나는 고지혈증을 알아보기

Table 2. Changes in hematological parameters of the experimental animals (%)

	RBC	WBC	ALP	T. cholesterol	Triglyceride	Insulin
A	100.0 ± 0.46	100.0 ± 0.85	100.0 ± 1.19	100.0 ± 10.40	100.0 ± 31.73	100.0 ± 6.73
B	83.3 ± 2.39	$43.7 \pm 11.69^*$	83.3 ± 13.83	119.1 ± 4.16	82.5 ± 14.05	95.3 ± 9.65
C	81.4 ± 13.17	74.3 ± 29.98	91.2 ± 4.53	94.1 ± 6.24	80.7 ± 14.50	130.8 ± 5.13
D	$77.8 \pm 8.09^*$	$53.8 \pm 1.02^*$	91.7 ± 3.82	94.8 ± 5.20	80.7 ± 14.50	$202.1 \pm 5.04^*$
E	91.5 ± 2.93	53.1 ± 24.20	$431.8 \pm 36.01^{**}$	193.3 ± 42.63	220.5 ± 37.17	5.8 ± 0.75
F	84.5 ± 6.93	$12.2 \pm 3.73^*$	$428.8 \pm 40.30^{**}$	195.5 ± 39.51	198.7 ± 6.35	4.7 ± 0.75
G	99.0 ± 1.54	36.5 ± 15.07	$464.9 \pm 33.63^{**}$	130.8 ± 14.56	203.2 ± 37.00	6.6 ± 2.63
H	$82.0 \pm 1.25^*$	56.7 ± 21.05	$241.8 \pm 50.23^*$	$117.6 \pm 10.35^*$	$82.0 \pm 24.56^*$	$69.1 \pm 4.56^{**}$

The values are mean \pm SEM (n=5). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

위하여 총 cholesterol과 triglyceride의 수치를 확인하였다. 대조군인 A군(100 ± 10.40)과 비교하여 KWNP 처리군인 C($94.1 \pm 6.24\%$), D군(94.8 ± 5.20)에서 콜레스테롤의 수치가 줄어들었으나 유의한 정도의 차이는 보이지 않았다. 하지만 당뇨군 사이를 비교한 결과 KWNP를 처리하지 않은 E($193.3 \pm 42.63\%$), F군($195.5 \pm 39.51\%$)에 비하여 KWNP를 처리한 실험군인 G($130.8 \pm 14.56\%$), H군($117.6 \pm 10.35\%$)에서 그 수치가 확연히 줄어들었으며 특히 H군에서 E군과 비교하여 유의한 차이($p < 0.05$)를 보였다. Triglyceride의 경우, 정상군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 당뇨군에서는 E군($220.5 \pm 37.17\%$)과 비교하여 H군($82.0 \pm 24.56\%$)에서 약 2배 이상의 유의한 감소를 나타내었다($p < 0.05$).

당대사의 조절에 있어 가장 중요한 호르몬인 insulin의 수치를 알아본 결과, 정상군에서는 A군($100.0 \pm 6.73\%$)과 비교하여 D군($202.1 \pm 5.04\%$)에서 유의적인 차이가 나타났다. 당뇨군에서는 E, F, G군 모두 5.8 ± 0.75 , 4.7 ± 0.75 , $6.6 \pm 2.63\%$ 로 매우 낮게 나와 당뇨병의 특징이 뚜렷하게 관찰되었으며 H군에서 특이하게 $69.1 \pm 4.56\%$ 로 약 10배 정도로 높은 수치가 나타났다($p < 0.005$).

4. 조직학적 변화 관찰

산화적 스트레스에 민감한 반응을 나타내는 정소에서

방사선을 조사한 B군은 A군에 비하여 정소 세정관의 직경 감소와 세정관 내부에 결친 공포화가 명확하게 관찰되었다. 당뇨군인 E군의 경우 그 정소 세정관은 B군과 비슷한 크기로 감소하였으나 세정관 내부전체가 심각하게 붕괴되어있는 것으로 나타나 방사선 조사군의 경우보다 더 큰 손상을 확인하였다. 방사선과 STZ를 처리한 F군의 경우 세정관의 크기는 다른 처리군에 비하여 좀 더 작게 관찰되었고 세정관 중앙부분의 공포화가 뚜렷하게 관찰되었다. 하지만 E군과 비교하여 그 손상의 정도가 적은 것으로 나타났다. 또 방사선과 STZ 처리 후 KWNP를 처리한 H군의 경우 A군에 비하여 그 정소 세정관 직경의 감소가 적게 나타났으며 세정관 중앙부분의 공포화가 일부 확인되었으나 다른 방사선 처리군과 당뇨군들과 비교하여 그 손상정도가 가장 적은 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

정소 내 세포자연사 유발 정도에 대한 실험군 차이를 알아보려고 포매해 둔 정소 조직을 이용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 방법을 사용하여 실험하였다. 세포자연사가 유발된 세포는 갈색으로 염색되어 나타나게 되는데, 대조군 A군에 비하여 방사선처리군 B군에서 세정관 내부조직에서 전반적으로 갈색으로 염색된 세포들이 관찰되었고, 간질조직내의 세포자연사 유발 세포는 찾아볼 수 없었다. 당뇨군인 E군의 경우 세정관 내부의 붕괴

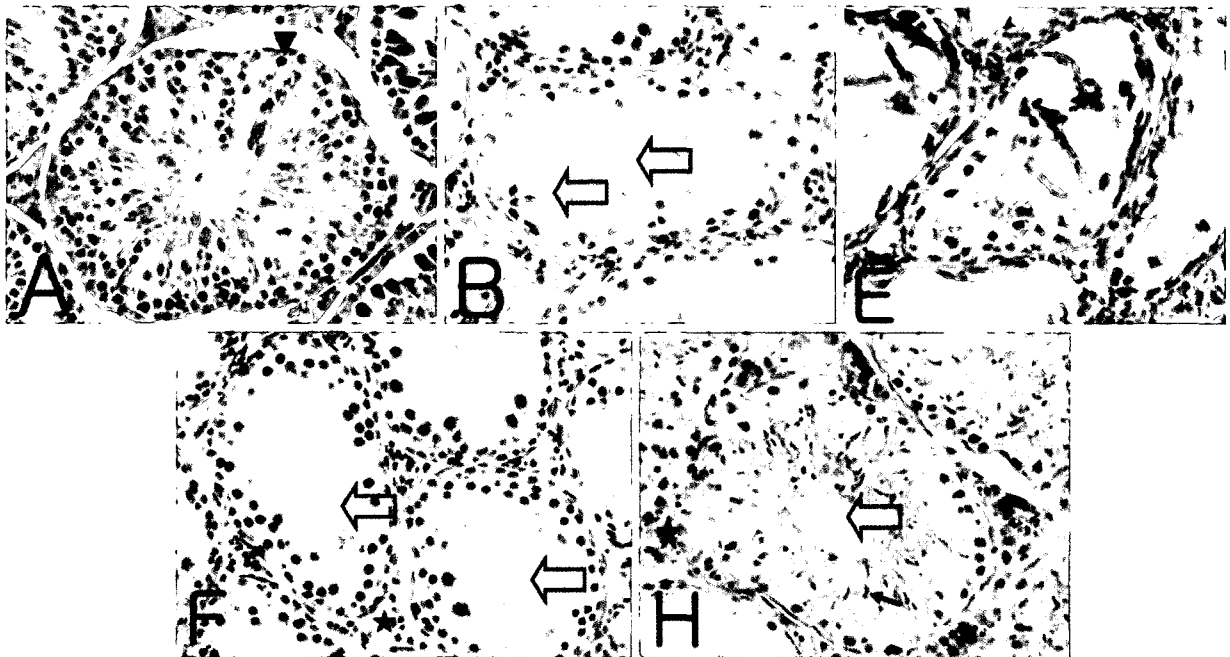


Fig. 3. Photomicrographs of section (5 μ m) of F344 rat testes in experimental group ($\times 400$). The slide stained with hematoxylin/eosin (H-E). Arrow, spermatid head; open arrow, vacuolation; star, interstitium; triangle, spermatocyte.

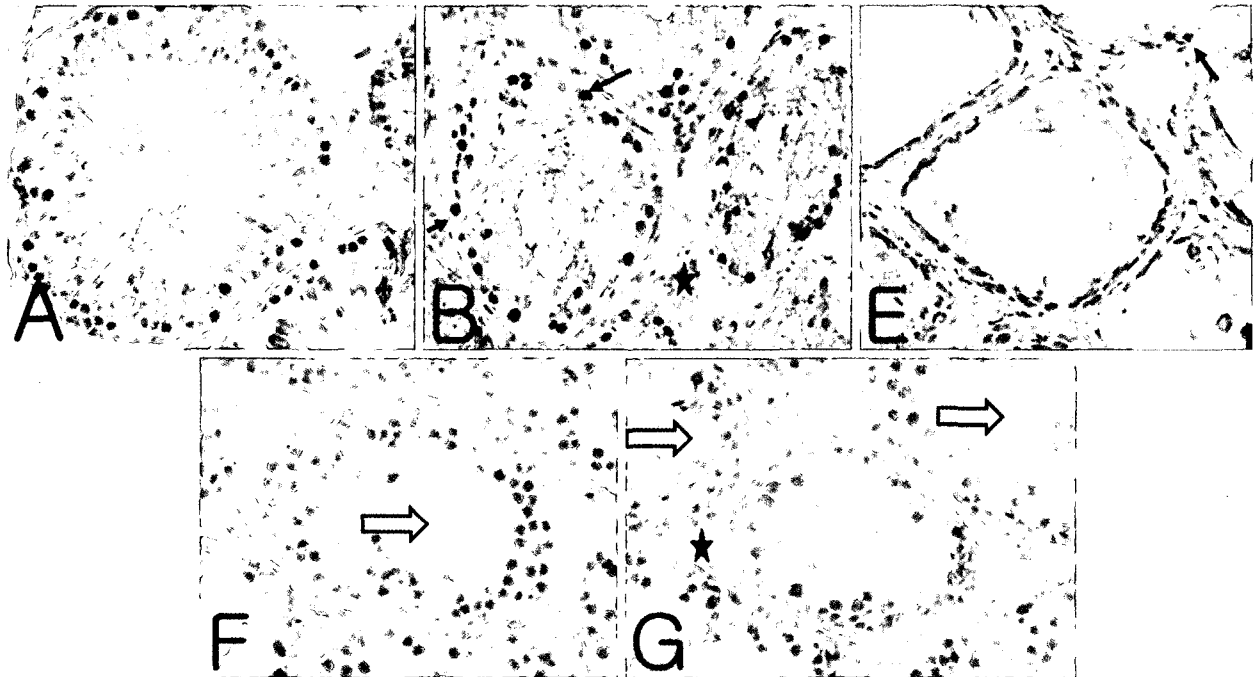


Fig. 4. *In situ* detection of apoptotic cells on the seminiferous tubules of the experimental animals ($\times 400$). Paraffin-embedded tissues were sectioned with the thickness of $5\ \mu\text{m}$. The sections were 3'-end labeled with digoxigenin-dUTP using terminal transferase to identify apoptotic cells. The counter staining was done by methyl green. Incorporated digoxigenin-dUTP was detected by digoxigenin antibodies conjugated with peroxidase. Brown colored cells (arrow) were presented an apoptotic cells. Arrow, apoptotic cell; open arrow, vacuolation; star, interstitium.

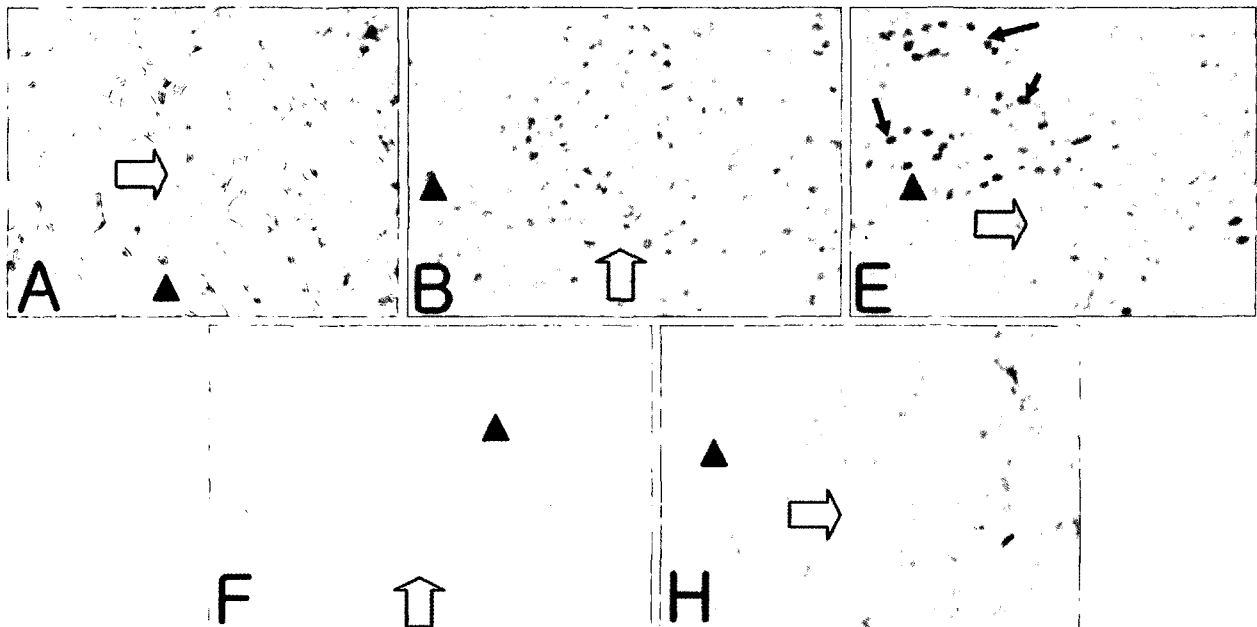


Fig. 5. *In situ* detection of apoptotic cells on the kidney of the experimental animals ($\times 400$). Paraffin-embedded tissues were sectioned with the thickness of $5\ \mu\text{m}$. The sections were 3'-end labeled with digoxigenin-dUTP using terminal transferase to identify apoptotic cells. The counter staining was done by methyl green. Incorporated digoxigenin-dUTP was detected by digoxigenin antibodies conjugated with peroxidase. Brown colored cells (arrow) were presented an apoptotic cells. Open arrow, glomerulus; arrow, apoptotic cell; triangle, brush border.

로 인하여 정상적인 세포를 찾아보기 힘들었다. F군과 H군에서는 대조군인 A군처럼 세포자연사 세포가 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4).

체액과 전해질의 균형(electrolyte balance)을 조절해 주며 혈압의 조절에 관여하는 renin과 적혈구의 생성을 자극시키는 erythropoietin이라는 호르몬을 생성하는 신장은 조직학적으로 특별한 차이는 보이지 않았으며 TUNEL 방법으로 염색하여 세포자연사가 유발된 세포를 관찰한 결과 당뇨군인 E군을 제외한 모든 처리군에서 갈색으로 염색된 세포가 거의 관찰되지 않았다. 당뇨군인 E군의 경우 세포자연사가 근위곱슬세관(proximal convoluted tubule)을 중심으로 관찰되었다(Fig. 5).

고 찰

인구의 고령화 및 급속한 식생활의 서구화, 생활양식의 변화는 우리나라의 당뇨병 환자를 급격하게 증가시키고 있다. 이러한 당뇨병은 치료하기 난해한 질병 중 하나로 치료 의약품과 함께 식이요법, 식품 첨가제 및 약초를 포함하는 대체 요법 사용이 많이 이루어지고 있다. 특히 치커리의 뿌리에 많이 포함된 것으로 알려진 이눌린과 fructan류들은 장내 미생물에 의해 발효되는 과정에서 단쇄지방산을 생성하고 생성된 단쇄지방산은 여러 대사경로를 통해 혈당 및 혈중 지질에 유익한 영향을 미치며 수용성 식이섬유, 당알콜, 저항성전분과 유사한 대사과정을 겪는 것으로 알려져 있다(Roberfroid *et al.* 1993). 이러한 치커리를 가공한 KWNP의 생체 기능 활성화 현상 및 특정 손상에 대한 회복 효과에 대한 생물학적 검증과 함께 그 효과에 대한 과학적인 접근을 하기 위해서 본 연구를 수행하였다.

실험은 STZ를 복강 주사하여 당뇨를 유발, 220 mg dL⁻¹ 이상인 실험동물을 이용하여 수행되었으며 방사선 전신 조사 실험군과 KWNP처리군 간의 각 항목 분석치를 비교, 분석하였다. 잘 알려진 유전독성물질인 STZ는 *Streptomyces achromogenes*에서 분리된 항생물질로 주로 랑게르한스섬 세포에 작용하여 제1형의 당뇨를 유발한다. 또한 STZ는 고혈당과 산화적 스트레스를 유발시킬 뿐 아니라 콩팥, 간, 췌장 등의 조직에 암을 유발하기도 한다고 알려져 있다(Bolzán and Bianchi 2002). 실험 5주간의 체중증가율은 방사선 처리군과 당뇨군 모두 대조군에 비하여 낮게 나타났으며 특히 당뇨군에서는 통계적으로 유의한 감소를 보였다(Table 1). 이는 당뇨병의 대표적인 증상 중 하나인 다뇨현상으로 인한 당을 포함한 배뇨의 횟수 및 양의 증가와 당뇨에 의한 체내대사의

퇴행적인 변화 때문인 것으로 사료된다(Lee *et al.* 1994). 자극에 민감한 생식기관 정소와 면역기관 비장, 또 당뇨병의 직접적인 병증이 나타나는 신장의 무게를 비교한 결과, 방사선을 조사한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 정소의 무게의 감소는 비교적 뚜렷하게 관찰된 반면 비장의 무게는 보고(Kim *et al.* 2004)와는 달리 무게의 유의한 감소는 관찰되지 않았다. 당뇨군에서는 정소의 무게감소가 대조군과 비교하여 현저하게 관찰되었으며 신장의 무게는 유의하게 증가됨을 알 수 있었는데 이러한 결과는 정소가 STZ에 민감한 기관임을 확인시켜주었으며 신장 비대의 경우 당뇨병에 의한 신장대사 변화 때문인 것으로 사료된다. Mauer 등은 1976년 보고에서 정상쥐의 췌장을 정상쥐에 이식하거나 당뇨주의 신장을 정상쥐에 이식할 경우 당뇨병에 의한 신장의 이상은 회복된다고 발표하였으며, Wesson은 신장비대를 관찰 비교하는 방법으로 흔히 체중에 대한 신장의 무게비를 사용하는 것이 당뇨쥐의 경우 체중의 감소가 동반되므로 과대평가될 가능성이 많다고 보고하고 있다(Fig. 1). 한편, STZ와 방사선, KWNP를 복합 처리한 실험군에서는 체중 증가율도 다른 당뇨군에 비하여 월등히 높게 나타났으며 정소의 무게도 증가하였고 신장의 무게는 감소함을 보였는데, 이는 Takaharu와 Kazuo가 2005년도에 발표한 γ 선을 조사한 경우, 당뇨쥐에 있어서 내생 항산화물질을 증가시켜 췌장의 랑게르한스섬의 β 세포를 보호하여 조사하지 않은 당뇨쥐에 비하여 더 많은 인슐린이 분비되었으며 이로 인해 혈당도 낮아진다는 보고를 토대로 당뇨병으로 인한 퇴행적 체내 대사가 일정부분 회복된 것으로 사료된다. 또한 KWNP의 비소화성 다당류가 식이에 대한 혈당 및 인슐린 반응을 감소시킨 것도 회복의 원인으로 작용했다고 사료된다.

실험 기간 중 공복 시 혈장 내 포도당의 변화를 살펴본 결과 당뇨군에서 특별한 유의성은 나타나지 않았다. 이는 치커리 추출물이 혈장 내 포도당을 떨어뜨린다는 보고(Lee *et al.* 1997)와는 다른 양상을 나타내었으나 식이섭취량이나 섭취시간 등의 실험적 오차로 인한 결과로 여겨진다. 이것은 실험전발의 식이섭취량이나 섭취시간의 영향을 받지 않는 총당화해모글로빈의 농도를 조사하여 비교해 보아야 할 것으로 사료된다.

혈액 내 지표인자의 수준 변화를 확인한 결과에 따르면, 적혈구의 경우 모든 실험군에서 감소하는 경향을 보였으며, 백혈구의 경우에는 방사선처리군, STZ와 방사선 복합 처리군, 당뇨군에서 낮은 수치를 나타냈다. 이러한 실험 결과는 이온화 방사선 조사가 조혈조직의 손상을 일으켜 골수 및 면역 기능을 저하시켜 백혈구 감소, 출혈, 빈혈, 기타 감염의 증가를 유발시킨다는 보고(Kim *et*

al. 2004)와 일치 하였으며 당뇨군의 경우 당뇨병의 산화 스트레스로 인한 결과라고 사료된다. 간질환, 간경변, 폐쇄성 황달, 골질환, 장질환, 암종을 알아볼 수 있는 alkaline phosphatase (ALP)의 측정 결과, 당뇨군에서 그 수치가 현저하게 높아짐을 확인할 수 있었는데, 이는 유전독성물질인 STZ가 간에 치명적이라는 보고와 일치하였다 (Bolzán and Bianchi 2002). STZ와 방사선, KWNP를 복합 처리한 실험군에서는 백혈구의 수치 및 ALP 수치를 측정한 결과 모두에서 방사선 처리군이나 당뇨군에 비하여 그 회복능이 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다. 당뇨병의 합병증으로 나타나는 혈중중성지방의 증가율을 알아보기 위하여 실시한 T. cholesterol과 triglyceride의 수치 확인 결과 KWNP를 처리한 모든 군에서 현저한 지질의 감소를 확인할 수 있어 KWNP가 당뇨병으로 인한 고지혈증에 효과가 있는 것으로 사료된다. 당대사의 조절에 있어 가장 중요한 호르몬인 insulin의 수치 측정 결과, STZ와 방사선, KWNP를 복합 처리한 실험군에서 다른 당뇨군과 비교하여 10배 정도 높은 insulin 수치가 측정되었다. 이는 앞에서 언급한 바와 같이 저선량의 γ 선을 조사가 내생 항산화물질을 증가시켜 췌장의 랑게르한스섬의 β 세포를 보호하여 조사하지 않은 당뇨 쥐에 비하여 더 많은 인슐린이 분비된다는 보고 (Schindl *et al.* 2002)와 일치한다.

자극에 민감하게 반응하는 생식소와 당뇨병에 의해 비대해지는 신장의 조직을 관찰하였다. 생식소인 정소의 경우, 방사선 처리군과 당뇨군 모두에서 정소 세정관의 직경 감소와 세정관 내부의 공포화가 관찰되었는데 특히 당뇨군의 경우 세정관 내부의 심각한 붕괴가 관찰되었다. 또한 세포자연사 유발 정도를 알아보기 위하여 실시한 TUNEL 방법에서는 방사선처리군에서는 세정관 내 정모세포의 자연사가 확인되었으며 당뇨군에서는 세정관 내부의 손상으로 인해 정상적인 세포를 찾아볼 수 없었다. 신장의 경우 유의한 형태적 차이는 관찰되지 않았으나 세포자연사가 유발된 세포를 관찰한 결과 당뇨군의 근위곱슬세관 부분에 세포 자연사가 중점적으로 발견되었다. 신장의 근위곱슬세관은 물 (85%)과 마그네슘 등의 전해질 및 포도당, 그 외에 아미노산, 단백질 등이 흡수되고 크레아틴과 다양한 색소 등이 배설되는 기관이다. 당뇨병으로 인한 단백질은 신사구체 기저막의 heparan sulfate 양의 감소로 보고되어 있는데 근위곱슬세관의 세포 자연사로 인한 아미노산 및 단백질의 흡수 기능의 약화도 그 원인이 될 수 있을 것이라 사료된다 (Raza *et al.* 2003). 또 이들 조직의 손상은 GSH (glutathione)의 함량과 GST (glutathione-S-transferase)의 활성과도 연관이 있을 것으로 사료되는 데 GSH는 생체

내 생성된 과산화수소 등의 독성물질을 해독시키며 단백질이나 DNA의 합성, 아미노산의 이동, 효소 활성의 조절 및 자유라디칼을 제거하여 이들에 의한 세포의 손상을 예방하는 데 관여하는 물질이며 GST는 이물질의 해독을 촉진시키는 효소이다. Sung 등은 STZ로 유발된 당뇨군에서는 이 GSH의 함량과 GST의 활성이 급격하게 줄었다고 보고하였는데 이로 인한 산화적 스트레스에 의해 조직의 손상이 일어났을 것으로 사료된다. 조직 관찰에서도 STZ와 방사선, KWNP를 복합 처리한 실험군에서 우수한 회복능이 관찰되었는데 이는 방사선 조사와 KWNP의 식이가 당뇨로 인한 산화적 스트레스를 현저히 감소한다고 여겨진다.

본 실험의 결과들을 통해 STZ 유발 당뇨에서의 KWNP의 혈중지질의 농도 감소와 방사선 조사와 KWNP의 식이가 당뇨의 산화적 스트레스로 인한 손상의 회복에 뛰어난 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 부가적인 실험을 통하여 실제로 사용할 수 있는 방사선의 준위와 KWNP의 식이 정도를 확인한다면 당뇨병의 대체요법으로 사용될 수 있을 것이다.

적 요

KWNP의 특정 손상에 대한 회복 효과에 대한 과학적인 접근을 하기 위해서 본 연구를 수행하였다. 실험은 STZ를 복강 주사하여 당뇨를 유발, 220 mg dL⁻¹ 이상인 실험동물을 이용하여 수행되었으며 방사선 전신 조사 실험군과 KWNP 처리군 간의 각 항목 분석치를 비교, 분석하였다. 실험 5주간의 체중증가율은 방사선 처리군과 당뇨군 모두 대조군에 비하여 낮게 나타났으며 특히 당뇨군에서는 통계적으로 유의적으로 낮았다. 정소와 비장, 또 당뇨병의 직접적인 병증이 나타나는 신장의 무게를 비교한 결과, 방사선을 조사한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 정소의 무게의 감소는 비교적 뚜렷하게 관찰된 반면 비장의 무게는 유의한 감소가 관찰되지 않았다. 당뇨군에서는 대조군과 비교하여 정소의 현저한 무게 감소가 관찰되었으며 신장의 무게는 유의하게 증가되었다. 혈액 내 지표인자의 수준 변화는 적혈구의 경우 모든 실험군에서 감소하는 경향을 보였으며, 백혈구의 경우에는 방사선처리군, STZ와 방사선 복합 처리군, 당뇨군에서 낮은 수치를 나타냈다. ALP의 측정 결과, 당뇨군에서 그 수치가 현저하게 높아짐을 확인할 수 있었고, STZ와 방사선, KWNP를 복합 처리한 실험군에서는 백혈구의 수치 및 ALP 수치를 측정한 결과 모두에서 방사선 처리군이나 당뇨군에 비하여 그 회복능이 현저히 높

은 것을 확인할 수 있었다. 혈중중성지방의 증가율 확인 결과 KWNP를 처리한 모든 군에서 현저한 지방의 감소를 확인할 수 있었다. 인슐린의 수치 측정 결과, STZ와 방사선, KWNP를 복합 처리한 실험군에서 다른 당뇨병군과 비교하여 10배 정도 높은 insulin 수치가 측정되었다. 조직학적 검경시 정소의 경우, 방사선 처리군과 당뇨병 모두에서 정소 세정관의 직경감소와 세정관 내부의 공포화가 관찰되었고 당뇨병의 경우 세정관 내부의 비가역적 손상이 관찰되었다. 신장의 경우 유의한 형태적 차이는 관찰되지 않았으나 당뇨병의 근위급슬세관 부분에 세포 자연사가 중점적으로 발견되었다.

사 사

본 연구는 중소기업청에서 시행하는 산학연 공동기술 개발 컨소시엄 사업의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Schindl A, G Heinze, M Schindl, H Pernerstorfer-Schön and L Schindl. 2002. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvasc. Res.* 64:240-246.
- Bolzán AD and SB Bianchi. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat. Res.* 512:121-134.
- Fukuda S, S Tsuchikira and H Iida. 2004. Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/Izm, SHRSP/Izm and WKY/Izm. *Exp. Anim.* 53: 67-72.
- Raza H, I Ahmed and A John. 2003. Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S-transferase in streptozotocin induced diabetic rats: modulation by *Momordica charantia* (karela) extract. *Life Sci.* 74: 1503-1511.
- Homma N. 1988. Bifidobacteria as a residence factor in human beings. 7:35-43
- Kim JK, JH Kim and YD Yoon. 2003. Evaluation of caffeine as a radioprotector in whole-body irradiated male mice. *In Vivo* 17:197-200.
- Kim JH, JK Kim and YD Yoon. 2004. Evaluation of biological effects of low concentrations of mercury chloride (II) and ionizing radiation in the prepubertal male rats. *Korean J. Environ. Biol.* 22:411-418.
- Lee JS, HS Son, YS Maeng, YK Chang and JS Ju. 1994. Effects of buckwheat on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.* 27:819-827.
- Lee JS, GS Lee and HK Shin. 1997. Effects of Chicory extract on the serum glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.* 30:781-788.
- Lee CJ, HH Park, BR Do, YD Yoon and JK Kim. 2000. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary. *Ani. Reprod. Sci.* 59: 109-117.
- Levrat MA, C Rmsy and C Demign. 1991. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted o different levels of inulin. *J. Nutr.* 35:525-552.
- Mauer SM, MW Steffes, AF Michael and DM Brown. 1976. Studies of diabetic nephropathy in animal and man. *Diabetes* 25:850-857.
- Morel DW and GM Chisolm. 1983. Antioxidative treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J. Lipid Res.* 30:1827-1837.
- Rhee SJ and JH Choi. 2001. Effects of green tea catechin on the superoxide dismutase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase activities of kidney in diabetic rats. *Korean J. Nutr.* 34:734-740
- Roberfroid M, GR Gibson and N Delzenne. 1993. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: An approach to calculate its caloric value. *Nutr. Rev.* 51:137-146.
- Şener G, N Jahovic, OB Tosun, M Atasoy and BÇ Yeen. 2003. Melatonin ameliorates ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rat. *Life Sci.* 74:563-572.
- Sung HJ, MH Kang, HK Chung, ES Song, MH Jeong, JB Lee and KS Min. 2001. Antioxidant effects of seamin and sesamol in streptozotocin-induced diabetes mellitus rat. *J. Fd Hyg. Safety.* 16:349-354.
- Takaharu N and S Kazuo. 2005. Effects of low dose-rate irradiation on the glucose metabolism in type II diabetes model mice. *Internat. Cong. Ser.* 1276:185-186.
- Vijayalaxmi, RJ Reiter, TS Herman and ML Meltz. 1998. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 397: 203-208.
- Wada K, H Miki, M Etoh, F Okuda, T Kumada and R Kusakawa. 1983. The inhibitory effect of lipid peroxides on the activity of the membrane bound and the solubilized lipoprotein lipase. *Jan. Clin. J.* 47:837-842.
- Wesson LG. 1989. Compensatory growth and other growth response of the kidney. *Nephron* 51:149-184.

Manuscript Received: June 1, 2005

Revision Accepted: April 26, 2006

Responsible Editorial Member: Kap Joo Park
(Konkuk Univ.)