한국영양학회지(*Korean J Nutr*) 2009; 42(8): 673~681
DOI 10.4163/kjn.2009.42.8.673

당뇨 쥐의 신장 염증 단계에서 단기간의 혼합 항산화 영양소 보충 식이가 산화적 스트레스와 염증반응의 조절에 미치는 영향*

박슬기 · 박나영 · 임윤숙§

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과, 생활과학연구소

Effects of Short Term Antioxidant Cocktail Supplementation on the Oxidative Stress and Inflammatory Response of Renal Inflammation in Diabetic Mice*

Park, Seul-Ki, Park, Na-Young, Lim, Yunsook§

Department of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a multifactorial disease. Particularly, diabetic nephropathy is a serious complication for diabetic patients, yet the precise mechanisms that underline the initial stage of diabetic renal inflammation remain unknown. However, oxidative stress induced by hyperglycemia in diabetes is implicated in diabetic renal disease. We hypothesized that dietary supplementation of antioxidants either VCE (0.5% VC + 0.5% VE) or Comb (0.5% VC + 0.5% VE + 2.5% N-acetylcysteine) improves acute diabetic renal inflammation through modulation of blood glucose levels and antioxidant and anti-inflammatory responses. Experimental animals (5.5 weeks old female ICR) used were treated with alloxan (180 mg/kg) once. When fasting blood glucose levels were higher than 250 mg/dL, mice were divided into 3 groups fed different levels of antioxidant supplementation, DM (diabetic mice fed AIN 93G purified rodent diet); VCE (diabetic mice fed 0.5% vitamin C and 0.5% vitamin E supplemented diet); Comb (diabetic mice fed 0.5% vitamin C, 0.5% vitamin E and 2.5% N-acetylcysteine supplemented diet), for 10 days and then sacrificed. Body weights were measured once a week and blood glucose levels were monitored twice a week. Lipid peroxidation products, thiobarbituric acid reacting substances were measured in kidney. NF-κB activation was indirectly demonstrated by pIκB-α and expressions of selective inflammatory and oxidative stress markers including antioxidant enzymes were also determined. Dietary antioxidant supplementation improved levels of blood glucose as well as kidney lipid peroxi-dation. Dietary antioxidant supplementation improved NF-κB activation and protein expression of HO-1, but not mRNA expression levels in diabetic mice fed Comb diet. In contrast, the mRNA and protein expression of CuZnSOD was decreased in diabetic mice fed Comb diet. However, antioxidant supplementation did not improve mRNA and protein expressions of IL-1β and MnSOD in diabetic mice. These findings demonstrate that acute diabetic renal inflammation was associated with altered inflammatory and antioxidant responses and suggest that antioxidant cocktail supplementation may have beneficial effects on early stage of diabetic nephropathy through modulation of blood glucose levels and antioxidant enzyme expressions. (*Korean J Nutr* 2009; 42(8): 673~681)

KEY WORDS: diabetic nephropathy, antioxidant, oxidative stress, inflammation, diabetes mellitus.

서 론

당뇨병은 만성적인 고혈당 증상으로 인하여 말초 장기에 손상을 일으키는 질환으로 전 세계적으로 발병률이 빠르게 증가하고 있다.[1] 당뇨병은 그 자체로도 문제이지만 고혈당으로 인한 심각한 합병증을 동반한다. 그 중 당뇨병성 신증은 당뇨병 3대 합병증으로 손꼽힐 만큼 중요한 장기 합병증 중 하나로, 새로 투석을 시작하는 말기 신부전증 환자의 40% 이상이 당뇨병 환자인 것으로 보고되고 있다.[2,3] 당뇨병에 의한 신장 질환은 주로 사구체 경화증, 초자질 변성, 세뇨관 간질염증으로 이어지며, 이 중 사구체 경화증은 가장 대표적인 신장 손상의 형태라 할 수 있다.[4] 뿐만 아니라

접수일 : 2009년 8월 18일 / 수정일 : 2009년 10월 26일
채택일 : 2009년 12월 1일
*This research was supported by grants from Korea Research Foundation (KRF-2007-028-C00278).
§To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ylim@khu.ac.kr

© 2009 The Korean Nutrition Society

당뇨병의 형태에 따라 발병 단계에도 차이를 보인다. 당뇨병에 의한 신장 질환발병 단계에는 당뇨병의 유형에 따라 다소 차이가 있기는 하지만 모두 마지막 단계에서는 당뇨병성 신증이 나타나므로 초기에 예방하지 않으면 만성 신부전으로 발병되기 쉽다. 따라서 당뇨병성 신증의 예방과 치료를 위해서는 초기 신 염증 단계를 유도하는 기전을 명백히 이해하는 것이 필요하다.

당뇨병성 신증의 병리 기전은 많은 연구에도 불구하고 아직 확실하게 규명되어 있지 않으나, 당뇨로 인한 고혈당이 중요한 인자로 작용하여 다양한 경로를 거쳐 각종 사이토카인, 성장인자, 혈관 조절 인자들의 변화를 유발한다고 알려져 있다.[5] 고농도의 포도당은 세포 내 protein kinase C (PKC)를 활성화 시키며, advanced glycation end products (AGE)와 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시킨다.[6] 특히, PKC는 diacylglycerol (DAG)과 함께 증가하며, 만성 고혈당으로 인해 혈관 투과성과 혈류의 조절, 신혈관생성을 포함한 당뇨 합병증의 병리에 포함되는 많은 과정에 참여한다.[5] 또한 증가한 AGE는 AGE 수용체와 결합하여 여러 사이토카인을 활성화 시키고, 세포 내 산화적 스트레스를 증가시켜 산화적 스트레스와 염증 반응 조절 인자인 nuclear factor kappa-B (NF-κB)를 활성화 시킨다.[5,7] 활성화된 NF-κB는 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등을 증가시키고, 이는 다시 NF-κB를 활성화 시켜 당뇨병성 신증의 발생을 촉진시킨다.[5,6] 증가된 TNF-α는 당뇨병성 신증 초기 단계에서 신장의 직접적인 손상을 유도하며, IL-1β는 신장섬유화에 관여하는 fibrionectin의 발현을 증가시킨다.[8] TGF-β1은 사구체 및 신장의 비대 원인으로 알려져 있으며, 지속적인 발현은 신장의 섬유화와 사구체 경화를 초래하여 만성신부전으로의 이행을 초래하게 된다.[4] 신생혈관형성에 관여하는 VEGF도 당뇨병성 신증에서 AGE에 의해 발현이 증가되어 당뇨병성 신증 발병에 기여한다.[9] 이러한 연구 결과들은 고혈당으로 인한 다양한 사이토카인의 지속적인 발현이 신장조직에 손상을 주어 만성신부전으로까지 발전될 가능성을 시사한다. 따라서, 당뇨병성 신증으로의 이행 전인 신 염증 단계에서 산화적 스트레스를 감소시키고 염증 인자들의 적절한 조절에 관여하는 영양소들의 공급은 당뇨의 증상을 완화시키는 것 뿐 아니라 당뇨병성 신증의 예방에 필수적이라 할 수 있다.

산화적 스트레스를 감소시키기 위한 선행 연구들에 의하면 당뇨를 유도한 쥐에게 항산화제인 glutathione (GSH)의 전구체인 N-acetylcysteine (NAC)을 보충 하였을 때 혈당이 저하되어 당뇨병이 호전되었고 부적절하게 활성화된 NF-κB를 정상화 시켰다.[10] 또한, 알파-토코페롤 보충은 혈장 지질 과산화물인 thiobarbituric acid reacting substance (TBARs)의 농도를 낮춰주고, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx)와 같은 항산화 효소의 활성을 높여주며 상처 치유율을 높여준 것으로 나타났다.[11] 뿐만 아니라 당뇨병성 신증을 유도한 쥐에서 비타민 C와 비타민E 첨가 식이가 혈당과 당화혈색소에는 뚜렷한 효과가 없었으나 지질과산화물의 감소와 SOD, GPx, catalase 같은 항산화 효소의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며,[12,13] GSH 첨가 식이는 신부전과 항산화 기능을 향상시키는 효과가 있었다.[13] 이와 같이 당뇨 자체나 합병증에서 혈당을 조절하고 산화적 스트레스를 감소시키기 위해 항산화 영양소들이 이용되었지만 단독 항산화 영양소를 사용한 경우가 대부분이었으며 아직까지는 그 효과가 제한적인 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 alloxan으로 유도한 당뇨 모델을 이용하여 단기간 항산화 영양소 (비타민C, 비타민 E, NAC)를 혼합하여 보충하였을 때 초기 당뇨성 신 염증 단계에서 증가된 산화적 스트레스와 염증 인자에 미치는 영향을 분자 생물학적 수준에서 규명하고자 한다.

연구방법

동물사육 및 당뇨유도

5.5주된 ICR 암컷 (Central Lab. Animal, Seoul, Korea)을 구입하여 온도 22~25℃, 습도 40~45%의 환경에서 한 cage에 4마리씩 넣어 일정기간 적응 시킨 후 당뇨를 유발하기 위해 0.9% 식염수에 alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA)를 녹여 180 mg/kg을 한 번 복강 내 주입하였다. 당뇨 유도 확인을 위해 꼬리 정맥을 이용하여 혈액을 채취 한 후 Accu-chek sensor (Roche Diagnostics Co., LTD, Seoul, Korea) 이용하여 항산화 식이 보충이 종료될 때 까지 일주일에 두 번씩 혈당을 측정하였다.[14]

식이공급

쥐 입고 후 당뇨 유발 전까지 chow diet (Genecode Co. LTD., Seoul, Korea)를 공급하였다. 혈당이 250 mg/dL 이상이 됨을 확인한 후 당뇨 대조군은 (DM) AIN-93G Purified Rodent diet를, 항산화 영양소 그룹은 대조군 식이에 1) 0.5% 비타민 C와 0.5% 비타민 E를 첨가한 군 (VCE, Sigma-Aldrich, St, Louis, MO. USA)과 2) 0.5% 비타민 C, 0.5% 비타민 E와 2.5% NAC을 첨가한 군 (Comb, Sig-

ma-Aldrich, St, Louis, MO. USA)으로 나누어 10일간 식이를 자유롭게 공급하였다. 각 식이 군의 식이 조성은 Table 1과 같다.[15)]

시료채취

항산화 보충 식이 후 isoflurane (Aerane liquid, Ilsung pharmaceuticals Co., LTD, Seoul, Korea)으로 마취시킨 후, 헤파린을 첨가한 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하고 2,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 혈장을 얻었으며 분석 시까지 −80℃에서 보관하였다. 장기는 복부를 절개하여 간과 신장을 채취한 후 바로 액체질소에 넣었다가 분석 시까지 −80℃에 보관하였다.

TBA법을 이용한 신장 조직 내 지질 과산화물 측정

지질 과산화물인 TBARs를 thiobarbituric acid (TBA) 법에 의해 측정하였다. 채취한 신장 조직 0.1 g과 0.15 M KCl 900 μL를 넣고 homogenizer를 이용하여 균질화 시킨 후, 균질화 된 시료 200 μL에 8.1% SDS를 200 μL넣고 약 10분 정도 실온에 방치하였다. 여기에 20% acetic acid-0.8% TBA mixture를 3 mL넣고 교반기를 이용하여 충분히 섞어 준 후, 3차 증류수를 600 μL를 넣고 95℃에서 60분간 반응시켰으며, 이를 즉시 냉각 시키고 증류수 1 mL와 n-butanol-pyridine (15 : 1 v/v) mixture를 5 mL 넣고 교반기를 이용하여 잘 섞어 주었다. 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 96 well에 200 μL씩 넣고 ELISA reader를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선을 얻기 위해 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA)을 표준용액으로 사용하였고, 농도는 각각 0, 40, 80, 120, 160, 180 nM로 제조하였다. 표준 검량선의 정확도는 R-square 값을 이용하였으며 (R2 ≥ 0.98),표준 검량선의 방정식에 각 시료의 흡광도 값을 대입하여 신장에서의 MDA 수치를 nM의 단위로 계산하여 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Experimental group		
	DM	VCE	Comb
	g/100 g		
Casein	20	20	20
Cornstarch	39.75	39.75	39.75
Dextrose	13.20	13.20	13.20
Sucrose	10.00	10.00	10.00
Cellulose	5.00	5.00	5.00
Soybean oil	7.00	7.00	7.00
t-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Salt mix	3.50	3.50	3.50
Vitamin mix	1.00	1.00	1.00
L-Cystine	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
Vitamin C[1)]	0	0.5	0.5
Vitamin E[2)]	0	0.5	0.5
NAC[3)]	0	0	2.5

1) Vitamin C: L-ASCORBIC ACID, > = 99.0%, CRYSTALLINE, Sigma-Aldrich St. Louis, MO., USA
2) Vitamin E: (+/−)-ALPHA-TOCOPHEROL, SYNTHETIC, > = 96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA
3) NAC: N-ACETYL-L-CYSTEINE, SIGMA GRADE, > = 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA

Total RNA 추출 및 Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

채취한 신장조직 0.1 g에서 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 Nano-spectrophotometer (Implen Inc., CA, USA)를 이용해 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구한 후, 5 μg의 RNA에 AMV reverse transcriptase 1 μL (Promega, San Luis Obispo, CA USA, 200 unit/μL), 25 mer oligo dT 1 μL (QIAGEN, Seoul, Korea), 10 mM dNTP 1 μL (Takara Korea Biomedical Inc., Seoul, Korea), 0.1 M DTT 2 μL (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S), 5X Reverse transcription buffer 4 μL (Promega, San Luis Obispo, CA USA)를 넣어 total volume이 20 μL가 되게 하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 5 μL에 10X PCR buffer 2 μL, 10 mM dNTP 0.4 μL, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μL, Taq polymerase 0.2 μL (Takara Korea Biomedical Inc., Seoul, Korea)와 100 pmol Cu/ZnSOD, MnSOD, IkB-α의 forward와 reverse primer (Cosmogenetech, Seoul, Korea)를 각각 1 μL (Table 2)를 넣어 total volume이 20 μL가 되게하였다. 만든 용액을 ABI RT-PCR system (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 이용하여 PCR을 진행한 후 만들어진 PCR products를 2% agarose에서 전기영동하였으며, internal control로 18S-rRNA를 이용하였다. 측정된 각각의 mRNA는 18S로 보정하여 상대적인 mRNA양을 image J program을 이용하여 정량하였다. 각각의 primer sequence는 Table 2와 같다.

단백질 추출 및 Western blot 분석

채취한 신장 조직 0.1 g을 protease inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA)가 포함된 lysis buffer를 이용하여 균질화한 후 14,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 단백질은 Nano-spectrophotometer (Implen Inc., CA, USA)를 이용하여 320 nm에서 흡광도

Table 2. Reverse transcriptase PCR primer sequences

Marker		Primer sequence	Product size
18S	Forward	5'-CGAGGAATTCCCAGTAAGTGC-3'	93 bp
	Reverse	5'-CCATCCATTCGGTAGTAGCG-3'	
CuZnSOD	Forward	5'-ATGAAAGCGGTGTGCGTGCTG-3'	444 bp
	Reverse	5'-AATCACTCCACAGGCCAAGCG-3'	
MnSOD	Forward	5'-GACCTGCCTTACGACTATGG-3'	385 bp
	Reverse	5'-GACCTTGCTCCTTATTGAAGC-3'	
IκB-α	Forward	5'- GACGAGGATTACGAGCAGAT –3'	634 bp
	Reverse	5'- CCTGGTAGGTTACTCTGTTG –3'	

를 측정한 뒤 농도를 구했다. 60 μg의 단백질을 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리한 후 membrane에 transfer시켰다. CuZnSOD, MnSOD, IL-1β, p-IkB-α, HO-1 단백질의 1차 항체와 2차 항체를 이용하여 반응시킨 후 ECL solution을 반응시켜 영상을 얻었으며, internal control로 β-actin을 이용하였다. 측정된 각각의 단백질은 β-actin으로 보정하여 Image J program을 이용하여 정량 하였다.

통 계

모든 값은 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, 모든 군 간의 유의성은 SPSS 11.0 SE를 사용하여 ANOVA로 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결 과

체 중

당뇨 대조군과 항산화 식이 보충군 간의 체중변화는 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다 (결과는 첨부하지 않았음).

혈 당

식이의 종류와 상관없이 당뇨군의 혈당 농도는 alloxan 주입 다음 날부터 증가하였다 (Fig. 1).

하지만 당뇨 발생 후 VCE와 Comb 군은 보충된 영양소의 종류에 상관없이 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 낮은 혈당을 유지하고 있었다.

신장 조직의 지질 과산화물

당뇨 대조군의 신장 조직 내 지질 과산화물 농도는 당뇨 대조군에 비해 항산화 보충 식이군에서 유의적으로 지질과산화물 농도가 감소하였다 (Fig. 2).

산화적 스트레스 및 염증 지표의 발현수준

항산화 식이 보충이 당뇨병성 신증의 발병에 있어서 산화적 스트레스와 염증성 지표를 mRNA와 단백질 수준에서 어떻게 조절하는 지에 대해 알아보기 위해 RT-PCR (mRNA)

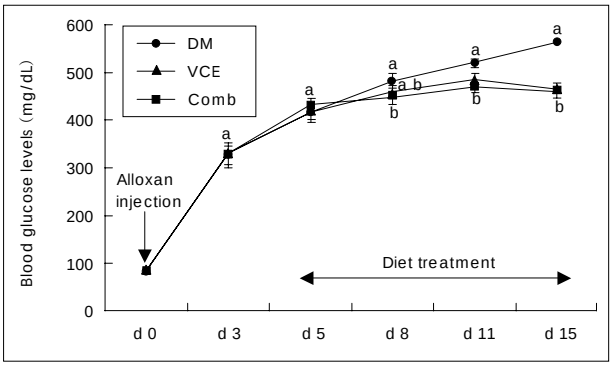

Fig. 1. Dietary antioxidant supplementation reduces blood glucose levels in alloxan induced diabetic mice. Mice were injected with alloxan (180 mg/kg). DM (diabetes mellitus), VCE (0.5% Vit C and 0.5% Vit E), Comb (0.5% Vit C and 0.5% Vit E and 2.5% NAC) Values are means ± SEM. Means for a variable without a common letter differ. $p < 0.05$.

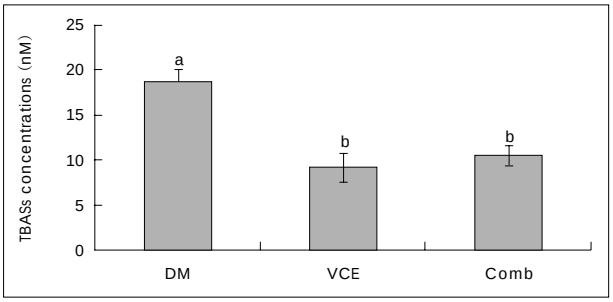

Fig. 2. Dietary antioxidant supplementation reduces renal lipid peroxidation in alloxan induced diabetic mice. DM (Diabetes mellitus), VCE (0.5% Vit C and 0.5% Vit E), Comb (0.5% Vit C and 0.5% Vit E and 2.5% NAC) Values are means ± SEM. Means for a variable without a common letter differ. $p < 0.05$.

과 Western blot (단백질)을 이용하여 각각의 지표들의 발현 수준을 측정하였다 (Fig. 3, 4).

산화적 스트레스 상태에서 여러 가지 염증성 인자와 산화적 스트레스 인자들의 발현을 조절하는 것으로 알려진 NF-κB를 간접적으로 측정한 IκB-α (mRNA)와 pIκB-α (protein)는 높은 수준으로 당뇨 대조군에서 유지되고 있으며, Comb군에서 유의적으로 그 수준이 저하된 것을 알 수 있었다. 그러나, mRNA 수준에서는 항산화 식이를 보충

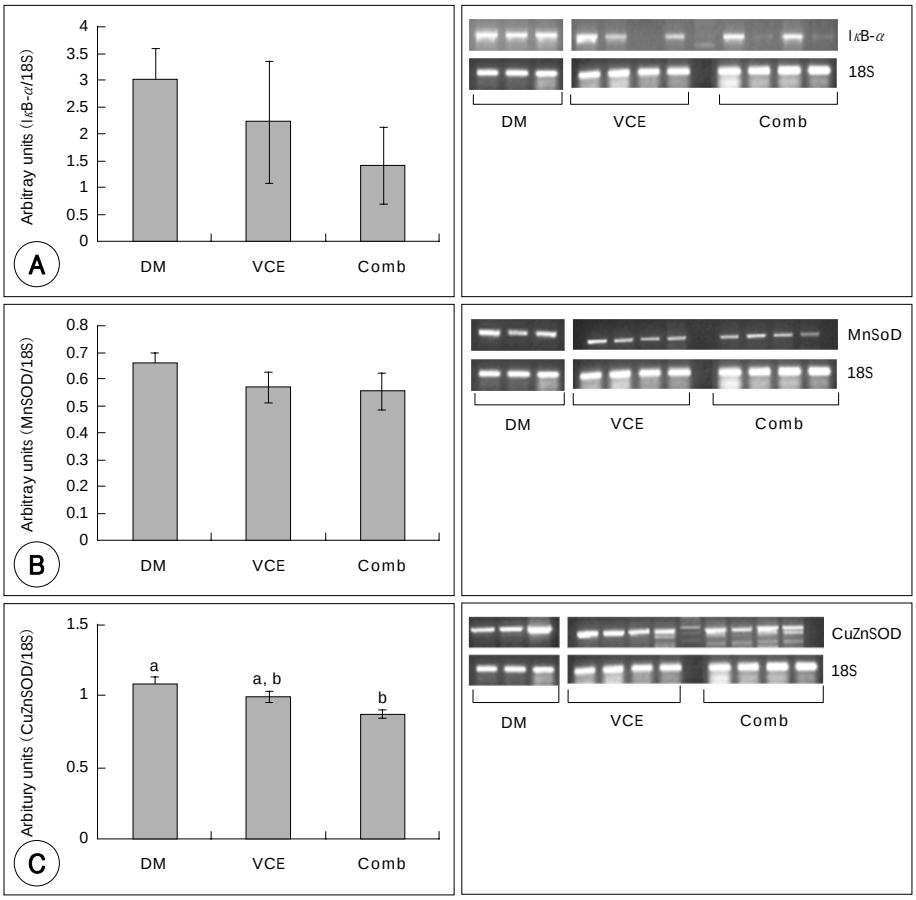

Fig. 3. Effects of antioxidant supplementation on mRNA expression levels of oxidative stress markers in diabetic kidney. DM (diabetes mellitus), VCE (0.5% vit C and 0.5% Vit E), Comb (0.5% vit C and 0.5% vit E and 2.5% NAC) Values are means ± SEM. Means for a variable without a common letter differ. $p < 0.05$. A: IkB-α (IkappaB-alpha). B: MnSoD (maganase superoxide dismutase). C: CuZnSOD (copper zinc superoxide dismutase).

한 그룹에서 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았다.

산화적 스트레스 상태를 반영하는 지표인 HO-1 (heme oxygenase-1)의 단백질 수준은 당뇨 대조군에 비해 Comb군이 유의적으로 감소하였으며 VCE의 경우 유의적인 차이는 없었지만 당뇨 대조군과 Comb군의 중간 수준을 나타내었다.

Pro-inflammatory cytokine인 IL-1β, TNF-α의 발현수준을 측정한 결과, 항산화 식이를 보충한 군이 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였으나 그룹간의 유의적인 차이는 보이지 않았다 (TNF-α의 결과는 첨부하지 않았음).

Superoxide radical을 제거하는 항산화 효소인 CuZnSOD와 MnSOD의 수준을 측정한 결과, 당뇨 대조군에 비해 혼합 항산화 식이를 보충한 군에서 발현수준이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, CuZnSOD는 mRNA와 단백질 발현 수준에서 Comb군이 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 낮아지는 경향을 보였다. 하지만 MnSOD는 mRNA와 단백질 발현에서 당뇨 대조군에 비해 항산화 식이를 보충한 군에서 낮아지는 경향을 보였으나 그룹간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

고 찰

당뇨병은 고혈당으로 인한 대사 장애로 신체 여러 장기에 합병증을 유발하는 질환으로 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 발병률이 빠르게 증가하고 있다. 이중 당뇨병성 신증은 흔히 발생하는 합병증으로, 만성 신부전으로 진행하여 중요한 사망의 원인이 되는데, 우리나라에서도 만성 사구체 신염에 이어 두 번째 원인으로 그 빈도가 해마다 증가하고 있다.[1] 본 연구에서는 비타민 C, 비타민 E, NAC를 혼합 섭취하였을 때 당뇨병성 신증으로의 이행 이전인 염증 단계에서 발생하는 혈당, 지질 과산화, 산화적 스트레스와 염증반응에 관여하는 인자들이 선택적으로 조절됨을 알 수 있었다.

항산화 영양소의 보충 자체는 혈당을 조절하는 효과가 없었다는 선행 연구들[12,13,16] 과는 달리 본 연구에서는 단기간

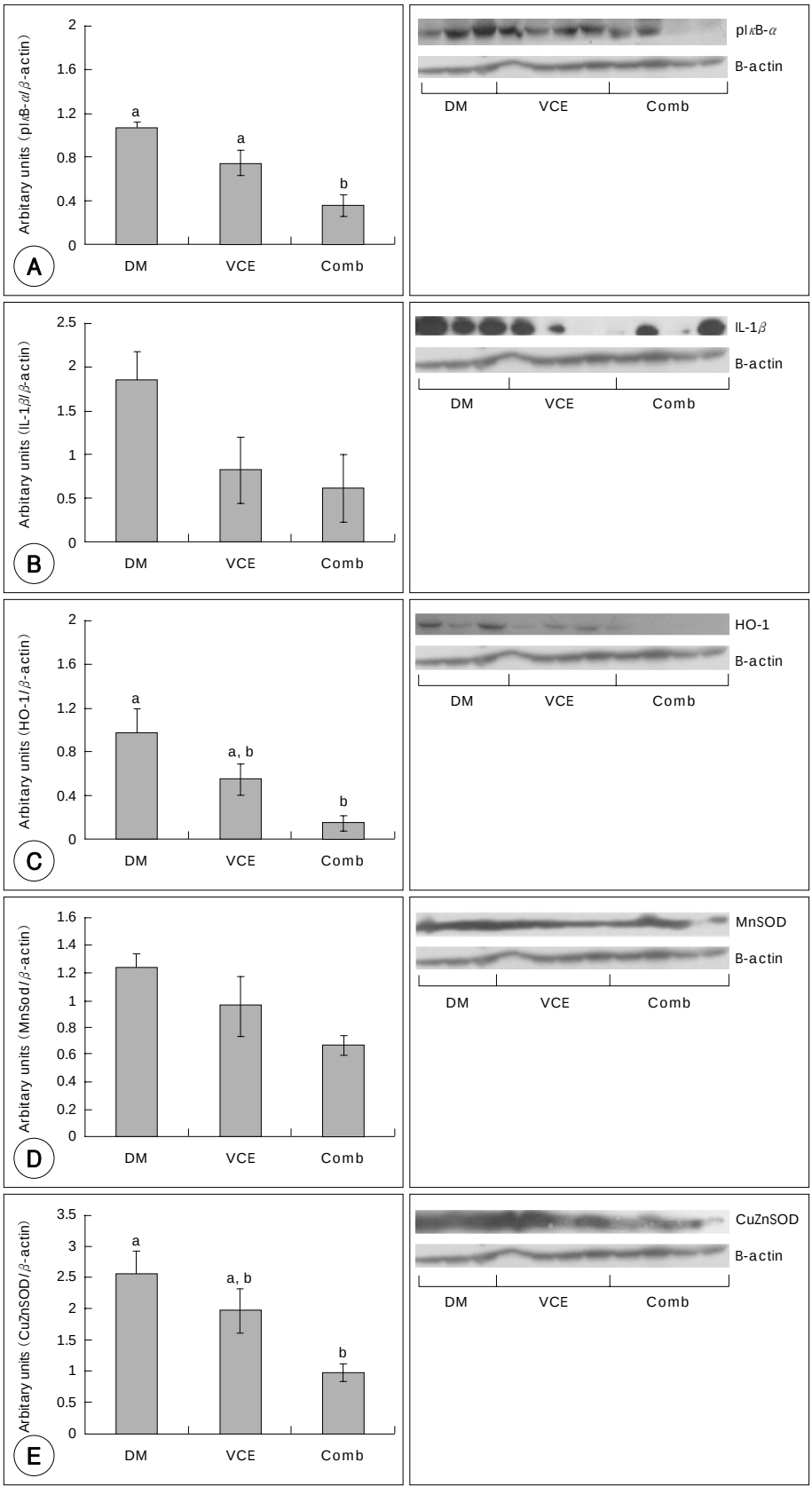

Fig. 4. Effects of antioxidant supplementation on protein expression levels of oxidative stress markers and pro-inflammatory cytokines in diabetic kidney. DM (diabetes mellitus), VCE (0.5% vit C and 0.5% Vit E), Comb (0.5% vit C and 0.5% vit E and 2.5% NAC) Values are means ± SEM. Means for a variable without a common letter differ. $p < 0.05$. A: p-IκB-α (phosphorylated- Ikappaβ-alpha). B: IL-1β (interleukin-1 beta). C: HO-1 (heme oxygenase-1). D: MnSOD (maganase superoxide dismutase). E: CuZnSOD (copper zinc superoxide dismutase).

의 혼합 항산화 식이 보충이 정상 수준과는 차이가 있었지만 당뇨 대조군에 비해 현저히 증가한 혈당을 유의적으로 완화시키는 효과가 있었다. 따라서, 혼합 항산화 식이의 보충이 좀 더 장기간 이루어진다면 혈당 수준의 정상화에 더욱 효율적일 것으로 사료된다.

당뇨로 인한 체중변화는 일반적으로 당뇨가 장기화될 때 나타나는 증상이지만 본 연구에서는 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않아 Inada 등[17]의 연구와는 유사하였으나 Lee 등[12]의 연구와는 차이가 있는 것으로 나타났다.[12,17] 이는 사용한 쥐의 종이나 주령, 당뇨 유도 약물 및 당뇨 유지 기간 등의 차이로 인해 나타나는 것으로 사료된다.

당뇨에 의해 증가된 산화적 스트레스는 자유 라디칼에 의한 지질과산화반응을 일으키고 지질과산화물을 생성함으로써, 산화적 스트레스의 대표적인 지표로 널리 이용되고 있다.[18] 지질과산화반응의 주 원인이 되는 자유 라디칼은 일상적인 체내 대사 과정 중에도 생성이 되지만 정상인들의 경우 이를 방어하는 기전이 체계화 되어 있기 때문에 큰 문제가 되지 않는다. 하지만 당뇨 상태에서는 자유 라디칼의 생성 속도가 촉진, 증가하게 되고 이를 방어하는 항산화 시스템이 저하되면서 산화적 스트레스가 증가하게 된다.[19-21] 따라서 조직의 과산화적 손상이 쉽게 초래된다고 할 수 있다. 본 연구결과, 지질 과산화물인 TBARs 농도는 alloxan 유발 당뇨 쥐의 신장에서 항산화 보충 식이를 하였을 때 감소 효과가 뚜렷하게 나타났다. 본 결과는 비타민 C나 NAC를 단독으로 보충 하였을 때 TBARs의 농도가 감소되었다는 선행연구[13,22]와 같은 결과를 나타내었다. 지질 과산화 정도의 감소 수준은 VCE군과 Comb군에서 비슷하여 NAC의 혼합이 신장내 지질 과산화 정도를 낮추는 효과가 크지 않음을 보여주었지만, 혼합 항산화 영양소 보충 식이 자체가 당뇨로 인한 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 초기 신장질환을 완화시킬 수 있음을 시사한다.

당뇨병성 신증의 주요 병리 기전은 고혈당이 중요한 인자로 작용하여 산화적 스트레스를 증가시키고 이로 인해 각종 사이토카인, 성장 인자, 혈관 인자들이 상호 작용을 통해 발생하는 것으로 알려져 있다.[5] 당뇨 시 증가한 혈당에 의해 발생한 산화적 스트레스는 염증성 인자 및 산화적 스트레스 인자의 발현을 조절하는 NF-κB를 활성화시키는데,[5,7] 본 연구 결과에서 나타난 IκB-α를 통해 간접적으로 알아본 NF-κB의 활성은 항산화 보충 식이를 통해 유의적으로 감소하였다. 본 결과는 당뇨병성 신증인 쥐에서 알파 토코페롤 및 토코트리에놀 (α, β, γ, δ mixture)을 보충하였을 때 NF-κB의 활성을 억제하였다는 Kuhad 등[23]의 연구결과와 유사한 경향을 보였으며, 알파 토코페롤과 비타민 C를 혼합한 VCE군보다 알파 토코페롤, 비타민 C에 NAC까지 혼합한 경우가 더욱 NF-κB의 활성을 저하시켜 지속적인 산화적 스트레스와 염증 반응을 저하시키는 것을 알 수 있다.

당뇨병 및 그로 인한 합병증으로 인해 증가한 산화적 스트레스에 의해 유도되는 Heme Oxygenase (HO)는 HO-1, HO-2, HO-3의 3가지 isoform을 가지는데, 그 중 HO-1은 inducible form으로 NF-κB 등과 같은 여러 스트레스 유도 인자들에 의해 발현이 증가된다.[24] 특히, 당뇨 합병증으로 인해 발병하는 신증 뿐만 아니라 초기 신장질환에서 염증반응에 중요한 인자로서 관여한다고 알려져 있다.[25] Vogt 등[25]은 당뇨성 신증시 초기 신장 염증 과정이 renal tubules의 HO-1 발현의 정도와 상관관계가 있음을 보고하였다. 본 연구 결과에서도 초기 당뇨성 신증에서 당뇨 대조군에 비해 항산화 식이를 보충한 Comb군에서 HO-1의 단백질 수준이 유의적으로 감소되었는데 이는 NF-κB 활성과 마찬가지로 혼합 항산화 보충 식이로 인해 감소된 산화적 스트레스로 인한 것으로 사료된다. 본 연구 결과는 VCE군의 경우, 비타민 E를 보충하였을 때 당뇨쥐의 사구체에서 HO-1의 발현 수준이 감소하였다는 선행연구들[24,26]과는 달리 유의적인 차이가 없었으나 Comb 혼합 보충 식이가 HO-1의 단백질 발현을 유의적으로 낮춰 NAC의 혼합 보충이 HO-1 발현의 저하에 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 하지만 염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)의 경우, IL-1β는 당뇨 대조군에 비해 항산화 식이를 보충한 군에서 감소하는 경향을 보이긴 하나 유의적인 차이를 보이지 않았으며 TNF-α의 발현도 군 간에 유의적으로 차이가 없었다. 본 결과는 당뇨 대조군에서 IL-1β의 발현이 유의적으로 높은 선행 연구[8]와 항산화 보충 식이에 의해 감소한 TNF-α의 발현이 정상화된 선행 연구[23]와는 달라 당뇨 유지 기간이나 식이 공급 기간 등에 의한 차이인 것으로 사료 된다. 따라서, 장기간의 항산화 식이 보충을 통해 산화적 스트레스와 당뇨병성 신증과의 상관성에 대해 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이라 사료된다.

항산화 상태를 반영하는 superoxide dismutase는 체내의 호기성 대사에 의해 생성된 superoxide radical을 제거함으로써 세포를 보호하는 항산화 효소로 알려져 있다.[27] Kim 등의[28] 연구에서는 SOD 활성도가 STZ만을 투여한 당뇨 대조군에서 정상군에 비해 증가되었는데 이는 당뇨 유발로 인해 단백질의 당화가 항진됨으로써 그 반응으로부터 ROS 형성이 현저히 증가되며, 이를 제거하기 위해 SOD가 활성화 된 것으로 보여진다.[29] 본 연구 결과 세포의 원형질에 존재하는 CuZnSOD의 mRNA, 단백질 발현 수준은 혼합 항

산화 식이를 보충한 VCE군과 Comb 군에서 감소하는 경향을 나타내었으나 NAC가 포함된 Comb군에서만 유의적인 것으로 나타났다. 미토콘드리아에 존재하는 MnSOD의 경우는 mRNA, 단백질 수준에서 항산화 식이를 보충한 VCE와 Comb 군에서 감소하는 경향은 보였으나 각 군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 따라서, 이 결과는 당뇨병성 신증 발병에 있어서 미토콘드리아에서 작용하는 MnSOD보다는 원형질에서 작용하는 CuZnSOD가 더 중요한 역할을 하는 것으로 사료되는데, 이는 혼합 항산화 식이에 의해 산화적 스트레스의 감소로 인하여 CuZnSOD의 발현이 감소된 것으로 사료된다.

종합적으로 볼 때 단기간의 혼합 항산화 영양소 (비타민 C와 E의 혼합과 NAC 혼합) 보충 식이가 당뇨에서 혈당을 완화시켰으며, 당뇨성 신장의 염증 단계에서 산화적 스트레스와 염증반응에 관여하는 인자들의 발현을 감소시켜 항산화 영양소의 혼합 보충이 초기 당뇨병성 신증을 조절할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구 결과는 혼합 항산화 영양소 보충을 이용하여 당뇨병성 신증의 예방과 개선에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 고혈당으로 인한 산화적 스트레스의 증가로 발생하는 것으로 알려진 당뇨병과 그 합병증인 당뇨성 신증의 예방과 개선을 목적으로 항산화 영양소 (비타민 C와 비타민 E의 혼합 식이, 비타민 C와 E, NAC의 혼합 식이)의 혼합 보충이 초기 당뇨병성 신장 염증 단계에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 실험 동물로는 ICR 암컷 5.5 주령 쥐에 alloxan (180 mg/kg, i.p.)을 주입하여 당뇨를 유도 한 뒤 혈당이 250 mg/dL 이상 지속되는 쥐들만을 실험에 사용하였다. 당뇨 유도 후 실험식이 [당뇨 대조군-AIN-93 G, 실험식이-VCE (0.5% vitamin C + vitamin E), Comb (0.5% vitamin C + vitamin E + 2.5% NAC)]를 10일간 공급하였고, 공급 기간 동안 혈당을 일주일에 두 번씩 측정하였다. 식이공급이 종료되면 쥐를 희생시켜 신장에서 지질 과산화물인 TBARs를 측정하였다. 또한 신장에서 산화적 스트레스 인자인 HO-1, IκB-α 및 p-IκB-α (NF-κB의 간접적인 측정), 염증성 인자인 IL-1β, 항산화 상태를 반영하는 SOD (CuZnSOD, MnSOD)를 RT-PCR과 Western blot을 이용하여 발현 수준을 측정 하였다.

혼합 항산화 식이 보충은 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 혈당을 감소시켜, 당뇨시 식이를 통한 혼합 항산화 영양소의 공급이 혈당을 정상화시키기는 부족하지만 완화시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 신장 조직 내 지질 과산화 정도도 혼합 항산화 식이에 의해 유의적으로 감소되었으며 신장 조직 내 산화적 스트레스 또는 염증 인자들 (HO-1, IκB-α, p-IκB-α, IL-1β), 항산화 인자들 (CuZnSOD, MnSOD)의 mRNA와 단백질 발현수준이 당뇨 대조군에 비해 혼합 항산화 식이를 보충한 군에서 선택적으로 감소하였다.

본 연구를 통해 식이를 통한 혼합 항산화 영양소의 보충은 고혈당증을 완화시키고 당뇨병으로 인해 증가한 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 당뇨병성 신장 염증을 개선 또는 지연시키는데 영향을 줄 것으로 사료된다. 그러나, 당뇨병성 신증 등의 당뇨 합병증의 발병에 대한 정확한 기전을 밝히는 것이 무엇보다도 중요하며, 당뇨성 신증의 예방과 치료를 위한 혼합 항산화 영양소를 사용하기 위해서는 정확한 농도와 사용 기간 등을 달리한 폭 넓은 연구가 병행 되어져야 할 것으로 사료된다.

Literature cited

1) Brem H, Tomic-Canic M, Entero H, Hanflik AM, Wang VM, Fallon JT, Ehrlich HP. The synergism of age and db/db genotype impairs wound healing. *Exp Gerontol* 2007; 42(6): 523-531
2) Choe GH, No HJ, Kim BS, Kang SU, Han DS, Lee HY. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) is Increased in Diabetic Rat Glomeruli: Role of Angiotensin 2 (A2). *Korean J Nephol* 2007; 22(4): 366-373.
3) Ha HJ, Lee HB. Reactive oxygen species and diabetic nephropathy. *Korean J Nephol* 2004; 23(2): 425-427
4) Kim HY, Jang JH, Han SM, Ahn KS, Park SB, Kim HCl, Park KK. Expression of Transforming Growth Factor-beta1 Spontaneously Developed Diabetic Rats. *Korean J Nephol* 2003; 22(2): 165-173
5) Kim IJ, Kim BW, Ha SW, Kim DW, Kim YK, Kim TH, Park JY, Yu HJ, Lee MK, Lee IK, Cha BY. Hyperglycemia and oxidative stress. Biology Research Information Center 2003; 5(6): 1-7
6) Lee H, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc* Nephrol 2003; 14(8): 241-245
7) Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F645-F659
8) Navarro JF, Mora C. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(12): 2601-2604
9) Han DC. Role of VEGF in diabetic nephropathy, Korean J Nephrol 2000; 19(2): 118-122
10) Ho E, Chen G, Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *Faseb J* 1999; 13(13): 1845-1854
11) Musalmah M, Fairuz AH, Gapor MT, Ngah WZ. Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal

and diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002; 11(7): S448-S451.
12) Lee E, Lee, MY, Hong SW, Chung CH, Hong SY. Blockade of oxidative stress by vitamin C ameliorates albuminuria and renal sclerosis in experimental diabetic rats. *Yonsei Med J* 2007; 48(5): 847-855
13) Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr* 2002; 132(5): 897-900
14) Ho E, Quan N, Tsai YH, Lai W, Bray TM. Dietary zinc supplementation inhibits NFkappaB activation and protects against chemically induced diabetes in CD1 mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226(2): 103-111
15) Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Benefical Effects of Antioxidants in Diabetes: Possible protection of pancreatic β-cell against glucose toxicity. *Diabetes* 1999; 48: 2398-2406
16) Kedziora-Kornatowska K, Szram S, Kornatowski T, Szadujkis-Szadurski L, Kedziora J, Bartosz G. Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2003; 95(4): e134-e143
17) Inada A, Kanamori H, Arai H, Akashi T, Araki M, Weir GC, Fukatsu A. A model for diabetic nephropathy: advantages of the inducible cAMP early repressor transgenic mouse over the streptozotocin-induced diabetic mouse. *J Cell Physiol* 2008; 215(2): 383-391
18) Yue KKM, Chung WS, Leung AWN, Cheng CHK. Redox changes precede the occurrence of oxidative stress in eyes and arota, but not in kidneys of diabetic rats. *Life Sci* 2003; 73(20): 2557-2570
19) Garg MC, Ojha S, Bansal DD. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 1996; 34(3): 264-266
20) Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997; 46(11): 1853-1858
21) Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozocin- and alloxan-induced H2O2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets: H2O2 as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 1991; 40(9): 1141-1145
22) Odetti P, Pesce C, Traverso N, Menini S, Maineri EP, Cosso L, Valentini S, Patriarca S, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA. Comparative trial of N-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. *Diabetes* 2003; 52(2): 499-505
23) Kuhad A, Chopra K. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. *Life Sci* 2009; 84(9-10): 296-301
24) Hayashi K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Isshiki K, Kikkawa R. Enhancement of glomerular heme oxygenase-1 expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; 52(2): 85-96
25) Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA. Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J Clin Invest* 1996; 98(9): 2139-2145
26) Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S250-S253
27) Emerit J, Michelson AM. [Free radicals in medicine and biology]. *Sem Hop* 1982; 58(45): 2670-2675
28) Kim MJ, Cho SY, Lee MK, Shin KH. Effects of Aralia elata Water Extracts on Activities of Hepatic Oxygen Free Radical Generating and Scavenging Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33(4): 653-658
29) Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(5): 339-352