

손바닥선인장 복합물이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨 쥐의 지질대사에 미치는 효과

†윤진아

배화여자대학교 식품영양과

Effects of *Opuntia ficus-indica* Complex on Lipid Metabolism in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

†Jin A Yoon

Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 110-735, Korea

Abstract

This study was conducted to examine the effects of *Opuntia ficus-indica* complex (OF) on the lipid metabolism, bile acid in feces, alanine aminotransferase (ALT) activity, aspartate aminotransferase (AST) activity, composition of urine and expression of cholesterol related mRNA in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Thirty two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into non-diabetic control (NC), diabetic control (DC), diabetic OF of 2% (OF-2) and diabetic OF of 5% (OF-5), then each group was fed for 3 weeks. Plasma total cholesterol, non-esterified fatty acids (NEFA), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) were decreased significantly ($p < 0.05$) in OF-5 group compared to DC, but high density lipoprotein (HDL) was not changed. AST and ALT were also reduced and bile acid excretion was improved. Composition of urine in OF-5 was almost same in NC. The expression of cholesterol 7 α -hydroxylase (*CYP7A1*), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA-R), Low density lipoprotein receptor (LDL-R) mRNA indicated that feeding OF have the effects of cholesterol decreation in plasma by synthesis of bile acid from cholesterol. These results provide experimental evidence about improved lipid metabolism of the OF feeding in the STZ-induced diabetic rats.

Key words: *Opuntia ficus-indica*, streptozotocin, total cholesterol, NEFA, *CYP7A1*

서론

제1형 당뇨병은 전체 당뇨 중 약 10% 정도의 비율을 차지하며, 자기면역이상, 유전적 요인 등에 의해 췌장 내 랑게르한스섬의 β -세포가 파괴되어 인슐린이 생성되지 못하기 때문에 발생하는 것으로 알려져 있다(Lee TH 1999). 인슐린 분비에 이상이 생김에 따라 포도당 대신 지방산을 이용하기 위해 VLDL(very low density lipoprotein) 합성이 증가되고, 또한 당뇨로 인한 HDL(high density lipoprotein)의 구조 변화와 아포

지단백의 A-1당화로 HDL이 콜레스테롤 에스테르 운반단백질에 의해 VLDL, LDL(low density lipoprotein) 등으로 이동되며, 지단백 분해효소와 LDL-수용체의 활성이 감소하여 고지혈증 유발률이 높아진다(Lee & Lee 1998).

이러한 지질대사의 변화는 또한 고혈당과 적혈구막 및 세포내 소기관막을 비롯한 생체막의 지질성분의 조성을 변화시켜 지질과산화를 일으키고, 동맥경화증을 유발하게 된다(Goldberg RB 1981). 동맥경화증은 다시 중성지질과 콜레스테롤 함량 증가, LDL의 조직으로 이동속도 감소 및 HDL 함

† Corresponding author: Jin A Yoon, Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 110-735, Korea. Tel: +82-2-399-0768, Fax: +82-2-737-8431, E-mail: yoonjina@hanmail.net

량 감소 등의 이상을 발생시킨다(West 등 1983). 이로 인한 말초혈관질환, 관상동맥질환 등의 동맥 경화성 합병증 발병율은 정상인에 비해 당뇨 환자가 2~5배 높으며(Goldberg RB 1981), 당뇨로 인한 사망 원인의 70~80% 정도를 차지하는 것으로 보고되어 있다(Choi & Lee 1995). 또한 당뇨와 그의 합병증의 치료법인 약물요법은 화학물질을 사용하고 있어 부작용과 환자의 내성이 문제가 되고 있다(Yoon & Son 2009). 이에 부작용이 적은 천연물을 이용한 당뇨와 그의 합병증의 치료제 개발은 중요한 의미를 가진다.

손바닥선인장의 일종인 노팔(*Opuntia ficus-indica*)은 우리나라에서 백년초라는 이름으로 불리기도 하고, 당뇨 개선, 혈당 및 콜레스테롤 수치를 감소시켰음이 보고된 바 있다(Fernandez 등 1992; Yoon & Son 2009). 이 외에도 선행 연구(Zhang 등 2004; Lim & Choi 1997; Yadav 등 2004; Xie 등 2002; Yang 등 2006; Yoon & Son 2009; Yoon 등 2011; Yoon JA 2013)에서는 목단피, 지황, 천화분, 호로파, 산약, 삼칠근 등의 천연물과 이들의 복합물이 갖는 약리 효과(혈당 강하, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈중 LDL의 감소, 혈중 중성지방의 감소, 혈중 유리지방산의 감소 등)가 알려져 있다.

따라서 본 연구는 당뇨 환자의 고혈당과 비정상적인 지질 대사 개선을 통해 당뇨 합병증 발병 위험을 감소시키고, 화학물질이 아닌 부작용이 적은 천연물들을 혼합하여 각각의 천연물질들보다 우수한 기능을 가진 복합물을 제조하여 새로운 당뇨 치료제를 개발하는 연구의 일환으로 STZ(Streptozotocin)에 의해 당뇨가 유발된 쥐에게 손바닥선인장을 주재료로 한 천연물복합물을 급여하였을 때 지질대사 개선 효과를 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 손바닥선인장 복합물(OF) 제조

본 실험에 이용된 손바닥선인장 복합물(Opuntia Complex; OF)에는 *Opuntia ficus-indica*(L.) Mill 65%, *Trichosantes kirilowii* Maxim과 *Paeonia suffruticosa* Andrews가 각 7%, *Rehmannia glutinosa* Liboschitz · *Trigonella foenum-graecum* L. · *Dioscorea batatas* Decaisne이 각각 6%, *Panax notoginseng*(Burk.) F. H. Chen이 3%가 포함되었다. 손바닥선인장 줄기는 멕시코산, 그 외의 원료는 중국산으로, 건조된 상태로 구입하여 Disc mill(BM-D-100, McCoy Corporation, San Marcos, TX)과 Cyclone mill(3010-039, UDY Corporation, USA)로 분쇄한 뒤 OF 제조에 사용되었다.

2. 실험동물 및 실험 설계

8주령 Sprague-Dawley Rat 수컷 32마리(평균 체중 250±10

g)를 본 실험에 이용하였고, 실험기간은 2006년 4월~2006년 5월 사이에 3주간 시행하였다. 1주일 동안 기초식을 급여하면서 적응기간을 가진 후 무작위로 4개 군으로 나누어 정상군(Non-diabetic Control, NC), 당뇨 대조군(Diabetic Control, DC), 당뇨를 유발하여 2% 노팔 복합물(OF-2)과 5% 노팔 복합물(OF-5)을 급여한 당뇨 실험군으로 각 군마다 각각 8마리씩 나누어 배치하였다. 모든 개체는 금속 cage에 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실내 환경은 온도 20~25°C, 습도 60~70%, 광주기 12시간을 유지하였다.

기초식은 AIN-76(American Institute Nutrition-76)의 사양 표준에 준하여 제조되었다. 정상군과 당뇨 대조군은 기초식을, OF-2군과 OF-5군은 기초식에 각각 2%와 5% 수준으로 노팔 복합물을 첨가한 실험사료를 자유급식(*adlibitum feeding*)시켰으며, 음수는 수돗물을 자율 섭취케 하였다.

3. 당뇨 유발

7일간 적응기간 후 실험동물을 12시간 동안 절식시킨 다음, DC · OF-2 · OF-5군은 STZ를 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시켜 STZ 50 mg/kg씩 1회 복강 주사하였다. 24시간 경과 후 요당 측정용 strip(Uriscan GP2; YD-diagnostics Co., Seoul, Korea)을 통해 당뇨 유발 여부를 확인하였다. 요당이 300 mg/dl 이하로 당뇨 유발이 불명확한 개체는 STZ 용액을 2회 복강 주사하고, 또 다시 24시간 경과 후 당뇨 유발 정도를 확인하여 300 mg/dl 이하인 것은 3회 복강 주사하였다. 그리하여 최종 당뇨 유발 후 12시간 절식시켜 공복 시 혈당이 300 mg/dl 이상에 이르도록 하였다. 당뇨를 유발하지 않은 정상군은 동량의 saline 용액을 주사하였다.

4. 식이섭취량, 체중 및 혈당

식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였고, 체중은 실험 시작 전과 실험식을 급여한지 3주 후 측정하였다. 혈당은 실험식을 급여한지 3주 후 12시간 절식시켜 공복 시 혈당을 혈당측정기(MyCare GAM 2200; Green Cross Co., Seoul, Korea)로 측정하였다.

5. 혈액 채취

실험식이 급여 1, 2주의 혈액은 실험동물을 12시간 절식시킨 후 꼬리정맥에서 500 μ l씩 채혈하였고, 3주의 혈액은 12시간 절식시킨 후 케타민 액(YnHan Co. Seoul, Korea)과 럼폰액(Bayer Korea Co., Seoul, Korea)을 1:1로 혼합한 용액을 2.5 ml/kg 수준으로 주사하여 마취시킨 후 심장에서 채혈하였다. 혈액은 채혈 직후 얼음에 3분간 정지한 뒤 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 혈장을 분석하였다.

6. 혈액 분석

혈장 중 중성지방 함량은 Glycerol kinase(GK)-Glycerol phospho-oxidase(GPO)법을 이용한 kit(SY-diagnostics Co., Seoul, Korea)를 사용하여, 505 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 공식에 의해 계산되었다.

$$\text{혈장 중성지방 농도 (mg/100 ml)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도}$$

혈장 중 유리지방산(non-esterified fatty acid, NEFA)의 함량은 Acylcoenzyme A synthetase(ACS)법을 이용한 kit(SY-diagnostics Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

혈장 중 총 콜레스테롤의 함량은 cholesterol ester hydrolase, cholesterol oxidase 및 hydrogen peroxidase를 이용한 효소법으로 kit(SY-diagnostics Co., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였는데, 중성지방 측정과 마찬가지로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{혈장 총 콜레스테롤 농도 (mg/100 ml)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도}$$

혈장 중 HDL의 함량은 dextran sulfate와 magnesium sulfate를 이용하여 LDL과 VLDL의 lipoprotein을 침전시킨 후 상층액에 남아있는 HDL 중의 콜레스테롤을 측정하였으며, kit(SY-diagnostics Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 500 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{HDL 농도 (mg/100 ml)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도} \times \text{희석계수}^*$$

*희석계수: {(혈장량 + 시약) / 혈장량} = 1.1

혈장 중 LDL은 Hitachi 7600-110(auto system, Hitachi Co., Japan), LDL-C plus(Roche) 시약을 사용하여 homogeneous enzymatic colorimetric method로 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, VLDL 함량은 Friedewald 계산식에 준하여 산출되었다.

혈장 중 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 활성도 측정은 Reitman & Frankel(1957)의 방법에 따라 kit(SY-diagnostics Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 505 nm에서 증류수를 맹검으로 하여 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고, 여기서 얻은 검량곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

7. 분 시료 수집 및 담즙산 정량

분변은 실험기간 마지막 5일 동안의 분변 전량을 수집하여 -70°C 로 냉동시킨 후 동결 건조하여 담즙산 분석에 사용하였다.

담즙산은 Fausa & Skalhogg(1974)의 효소를 이용한 정량법에 준하여 측정하였다. 정량법의 반응 종결 후 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다(I). 이때 효소용액 대신에 0.1 M의 hydrazine hydrate 용액 2.5 ml를 첨가하여 동일하게 반응을 시켜 얻은 흡광도를 Control로 하였다(II). E_1 , E_2 는 I 과 II의 흡광도에서 각각 blank 흡광도와 차이 값을 구한 값이며, E_1 과 E_2 의 차이인 ΔE 는 3 α -hydroxyl group의 산화에 따른 NADH의 소멸지수이다.

$$\mu\text{mole 3 } \alpha\text{-hydroxyl bile acid/ml} = \frac{\Delta E \times 3 \times 1,000 \times C}{6.2 \times A \times B}$$

ΔE : the extinction of the unknown sample

6.2: the μmole extinction coefficient of ANDH at 340 nm

3: the total volume of reaction mixture

A= volume of extraction added to reaction mixture(10 μl)

B= quantity of fecal extracted(0.2 g)

C= total volume of fecal extraction(0.5 ml)

8. 유전자형 분석

적출된 간 조직 중 50 mg을 잘라내 즉시 액체 질소에 담겨 보관한 뒤 Trizol을 이용해 RNA를 추출하고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 계산하였다. 이를 이용해 cDNA를 합성하고, 이 중 1 μl 를 PCR에 사용하였다.

GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)는 F: GCCATCAACGACCCCTTCATT, R: CGCCTGCTTACCACC TTCTT의 primer를 이용하여 94°C 에서 4분간 방치한 후, 변성은 94°C 에서 30초, 재생은 60°C 에서 30초, 합성은 72°C 에서 30초씩 32회 반복한 후, 72°C 에서 5분 방치하였다. 동일 조건에서 HMG-CoA-R(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase)는 36회, LDL-R(Low density lipoprotein receptor)는 34회, CYP7A1(cholesterol 7 α -hydroxylase)은 28회 반복하였으며, 각 Primer들은 다음과 같다. HMG-CoA-R F: GCGTGCAAAGACAAT CCTGGAG, R: GTTAGACCTTGAGAACCCAATG, LDL-R F: ATTTTGGAGGATGAGAAGCAG, R: CAGGGCGGGGAGTG TGAGAA, CYP7A1 F: GCCGTCCAAGAAATCAAGCAGT, R: TGTGGGCAGCGAGAACAAAGT.

9. 통계 처리

본 연구에서 측정한 모든 수치들은 Mean±S.E.로 나타내었

고, Statistical Analysis System(SAS, version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA-test를 실시하였으며, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 식이섭취량, 체중 및 혈당

식이섭취량, 체중과 혈당은 Table 1과 같다. 3주간의 실험 기간 동안 섭취한 사료섭취량은 정상군(NC)은 483.23 ± 17.87 g이고, 당뇨대조군(DC)은 750.47 ± 23.53 g, 2% OF 급여군은 807.51 ± 30.67 g과 5% OF 급여군은 773.27 ± 20.32 g으로 월등히 높았으며, 이는 당뇨의 주된 증상 중 하나인 다식(多食) 현상에 의한 것으로 보인다(Yoon & Son 2009).

실험시작 전의 체중은 각 실험군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 3주간의 실험 후 체중은 NC 304.14 ± 6.40 g, DC 205.75 ± 9.34 g, OF-2 254.89 ± 3.64 g 및 OF-5 261.50 ± 6.01 g으로 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). STZ 투여로 당뇨가 유발된 쥐에서는 췌장의 랑게르한스섬 내에 인슐린을 생성하는 β -세포가 파괴되어 인슐린 생성이 저하되어 부족현상이 나타나게 된다. 그로 인해 포도당이 세포 내로 운반되지 못해 당대사에 의한 에너지 생산이 생리적으로 필요한 수준보다 부족하게 되며, 체내 단백질, 글리코젠 및 지질의 합성도 저하되고, 또한 그로 인하여 근육의 강도 증진도 저하되어 체중 감소를 나타내는 것으로 해석된다(Furuse 등 1993).

STZ로 당뇨를 유발한 쥐는 혈당이 450 mg/dl 정도로 NC군의 103.00 ± 2.65 mg/dl보다 높았다. 3주간의 OF를 급여한 OF-2군은 258.78 ± 24.3 mg/dl와 OF-5군은 170.71 ± 26.61 mg/dl로 DC군의 492.13 ± 15.27 mg/dl보다 혈당이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이러한 결과로 비추어 볼 때 OF는 혈당 강하 효과를 갖는다고 볼 수 있다.

2. 혈장 중 중성지방 및 유리지방산 함량

혈장 중 중성지방 함량은 Fig. 1A와 같이 정상군에 비해 당뇨대조군이 월등히 높았는데, 이는 당뇨 유발에 의한 당대사의 이상이 지질대사에 장애를 일으켜 나타난 것으로 보이며, 선행되었던 연구들도 이와 유사한 결과를 보였다(Han 등 2004). 인슐린은 lipoprotein lipase를 활성화 시켜 간에서 VLDL-콜레스테롤의 합성이나 말초조직에서의 지단백 분해효소 활

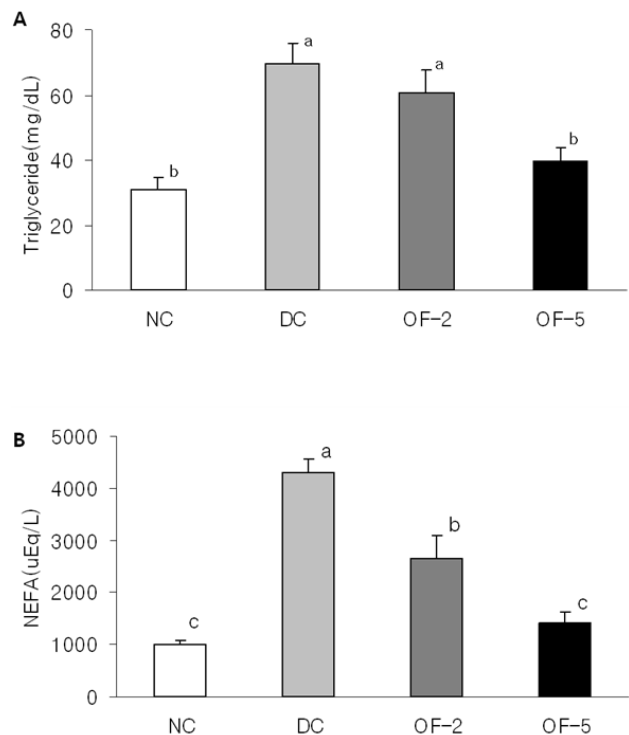


Fig. 1. Comparison of plasma triglyceride (A) and NEFA (B) by supplementation of OF in rats for 3 weeks. Values are mean \pm S.E., n=8, NEFA (non-esterified fatty acids), NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic Opuntia complex C - 2%, OF-5: diabetic Opuntia complex C - 5%, Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

Table 1. Effect of OF on diet intake, body weight and blood glucose in rats fed experimental diet for 3 weeks

Groups	Diet intake (g)	Body weight (g)		Blood glucose (mg/dl)	
		Initial	Final	Initial	Final
NC ²⁾	$483.23 \pm 17.87^{1) b3)}$	$253.71 \pm 4.25^{1) a3)}$	$304.14 \pm 6.40^{1) a3)}$	$103.00 \pm 2.65^{1) b3)}$	$99.67 \pm 6.6^{1) d3)}$
DC	750.47 ± 23.53^a	242.13 ± 4.41^a	205.75 ± 9.34^c	449.78 ± 28.24^a	492.13 ± 15.27^a
OF-2	807.51 ± 30.67^a	244.67 ± 4.44^a	254.89 ± 3.64^b	445.56 ± 24.83^a	258.78 ± 24.3^b
OF-5	773.27 ± 20.32^a	243.13 ± 5.69^a	261.50 ± 6.01^b	456.78 ± 26.34^a	170.71 ± 26.61^c

¹⁾ Values are mean \pm S.E., n=8

²⁾ NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic Opuntia complex C - 2%, OF-5: diabetic Opuntia complex C - 5%

³⁾ Values with different superscripts within same columns are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

성을 촉진하는 작용이 있기 때문에, 저 인슐린 혈증을 수반하는 당뇨병에서는 혈청 중 중성지질 함량이 증가하게 된다 (Vergès B 2009). 본 연구에서 5% 수준의 OF(OF-5) 급여 시 당뇨대조군에 비하여 중성지질 함량이 유의적($p<0.05$)으로 감소되는 것으로 볼 때 OF가 STZ으로 당뇨를 유발한 쥐에서 혈중 지질 증가를 억제함으로써 항고지혈증에 효과를 발휘하는 것으로 사료된다.

혈장 중 유리지방산 함량은 Fig. 1B와 같이 정상군에 비해 당뇨대조군이 월등히 높았는데, 이는 혈장 중 중성지방 함량과 같이 당뇨 유발에 의한 당대사의 이상이 정상적인 지질대사를 저해시켜 나타난 현상으로 보이며, 2%와 5% 수준의 OF(OF-2, OF-5) 급여 시 당뇨대조군에 비하여 혈장 중 유리지방산 함량이 유의적($p<0.05$)으로 감소한 사실로 보아, 이 역시 항고지혈증에 효과를 가진 인자가 존재하는 것으로 판단되었다.

3. 혈장 중 HDL, LDL, VLDL과 총 콜레스테롤 함량

OF를 급여한 당뇨 유발 쥐의 3주간 혈장 중 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 농도와 AI(atherogenic index)의 변화는 Table 2에 나타내었다. DC군의 총 콜레스테롤 함량은 $129.40 \pm$

6.40 mg/dl 로 NC군의 $67.00 \pm 5.57 \text{ mg/dl}$ 에 비하여 유의적($p<0.05$)으로 증가하였으며, 이는 기존의 다른 보고와 유사한 경향을 보였다(Kim SJ 2004). OF-2 급여 시에는 당뇨대조군에 비하여 21%, OF-5 급여 시에는 당뇨대조군에 비하여 38%의 유의적인 감소를 보임으로서 정상군의 총 콜레스테롤 농도와 근접한 수준까지 낮아졌다($p<0.05$).

HDL-콜레스테롤의 경우, 본 연구에서는 NC군($41.40 \pm 3.61 \text{ mg/dl}$)에 비하여 DC군($51.36 \pm 3.94 \text{ mg/dl}$), OF-2급여군($51.64 \pm 6.47 \text{ mg/dl}$)과 OF-5급여군($52.27 \pm 4.74 \text{ mg/dl}$)에서 유의적인 감소를 보이지 않았으며, 이와 유사한 결과가 기존 연구를 통하여 보고된 바 있다(Giron 등 1999; Yoon & Son 2009; Yoon JA 2013).

AI는 동맥경화지수를 나타내는 것으로, {(총 콜레스테롤 - HDL-콜레스테롤)/HDL-콜레스테롤} 식으로 산출하였다. 본 연구에서는 NC군(0.62 ± 0.06)에 비하여 DC군(1.55 ± 0.12)에서 유의적($p<0.05$)인 증가를 보였으며, OF-2군(1.15 ± 0.16)은 DC군에 비하여 유의적인 감소를 보이지 않았다. 하지만 OF-5군(0.56 ± 0.07)에서는 DC군에 비하여 유의적으로 감소하여 NC군과 비슷한 수준까지 낮아졌다($p<0.05$). Lee & Lee(1998)의 연구에 의하면 동맥경화지수는 당뇨 발병 후부터 증가하다가 일정 시간 경과 후에는 증가된 수준에서 유지되었는데, 이는 당뇨병이 동맥경화와 같은 혈관 질환과 밀접한 관련이 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

또한 OF를 3주간 급여한 당뇨 유발 쥐의 혈장 중 LDL과 VLDL의 함량을 Table 3에 제시하였다. LDL 함량은 NC군($15.00 \pm 1.61 \text{ mg/dl}$)에 비하여 DC군($57.40 \pm 3.61 \text{ mg/dl}$)에서 유의적으로 증가하였으나, OF-2군($33.80 \pm 2.01 \text{ mg/dl}$)은 DC군에 비하여 70%의 유의적인 감소를 보였고, OF-5군($16.00 \pm 1.51 \text{ mg/dl}$)은 DC군에 비하여 258%의 유의적인 감소를 보여 NC군과 비슷한 수준까지 낮아졌다($p<0.05$). Steinberg 등(1989)의 연구에 의하면 당뇨에서 나타나는 고지단백혈증, 고콜레스테롤 혈증은 LDL 함량이 증가된 때문이다. 또한 Urano 등(1991)의 연구에 의하면 동맥경화증의 발생 기전으로 당뇨병이나 고콜레스테롤혈증 환자의 경우 LDL이 산화되어 동맥혈관 벽의 내피세포를 손상시키고, 여기에 혈소판 등이 엉켜 동맥경화증이 유발된다.

본 실험에서 VLDL 함량은 NC군($10.17 \pm 0.76 \text{ mg/dl}$)에 비하여 DC군($19.93 \pm 1.22 \text{ mg/dl}$)에서 유의적($p<0.05$)인 증가를 보였으나, OF-2군($17.36 \pm 0.87 \text{ mg/dl}$)은 DC군에 비하여 별다른 감소를 보이지 않았다. 그러나 OF-5군(11.90 ± 0.83)은 DC군에 비하여 67%의 유의적($p<0.05$)인 감소를 보여 NC군과 비슷한 수준까지 낮아졌다. Rosenstock 등(1988)은 당뇨가 유발되면 LDL 생산이 증가되는데, 이는 VLDL의 생산 및 분비가 증가된 때문이라고 주장하였다.

Table 2. Effect of OF on plasma total cholesterol, HDL-cholesterol and AI in rats fed experimental diet for 3 weeks

Items	Groups	Weeks		
		1	2	3
Total-C ²⁾ (mg/dl)	NC ³⁾	64.37± 2.61 ^{1)ba4)}	67.74± 9.45 ^c	67.00±5.57 ^c
	DC	113.35±17.20 ^a	128.39±13.82 ^a	129.40±6.40 ^a
	OF-2	103.11± 3.97 ^a	101.29±14.95 ^b	102.80±5.43 ^b
	OF-5	89.82± 3.97 ^b	84.01± 5.86 ^{bc}	80.17±4.62 ^{bc}
HDL ²⁾ (mg/dl)	NC ³⁾	37.42± 2.01 ^{1)ba4)}	41.55± 5.32 ^a	41.40±3.61 ^a
	DC	41.10± 7.95 ^a	45.26± 3.41 ^a	51.36±3.94 ^a
	OF-2	46.71± 5.97 ^a	55.07± 5.33 ^a	51.64±6.47 ^a
	OF-5	59.87± 5.23 ^a	51.75± 6.06 ^a	52.27±4.74 ^a
AI ²⁾	NC ³⁾	0.73± 0.08 ^{1)bc4)}	0.63± 0.05 ^c	0.62±0.06 ^b
	DC	2.20± 0.34 ^a	1.99± 0.23 ^a	1.55±0.12 ^a
	OF-2	1.33± 0.15 ^b	1.07± 0.16 ^b	1.15±0.16 ^a
	OF-5	0.82± 0.10 ^c	0.60± 0.11 ^c	0.56±0.07 ^b

¹⁾ Values are mean±S.E., n=8

²⁾ Total-C(total cholesterol), HDL(high density lipoprotein), AI(atherogenic index) = {(Total-C) - (HDL-C)} / (HDL-C)

³⁾ NC: non-diabetic control, DC: diabetic control,

OF-2: diabetic Opuntia complex C - 2%,

OF-5: diabetic Opuntia complex C - 5%

⁴⁾ Values with different superscripts within same columns are significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

Table 3. Effect of OF on plasma LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol in rats fed experimental diet for 3 weeks

Items	Groups	Weeks		
		1	2	3
LDL ²⁾ (mg/dℓ)	NC ³⁾	5.13±1.71 ^{1)d4)}	14.54±1.21 ^c	15.00±1.61 ^c
	DC	53.73±3.24 ^a	62.26±3.84 ^a	57.40±3.61 ^a
	OF-2	39.55±2.12 ^b	35.68±1.62 ^b	33.80±2.01 ^b
	OF-5	25.66±1.37 ^c	16.97±1.94 ^c	16.00±1.51 ^c
VLDL ²⁾ (mg/dℓ)	NC ³⁾	13.07±1.27 ^{1)b4)}	11.65±0.96 ^b	10.17±0.76 ^b
	DC	19.11±1.07 ^a	20.07±0.83 ^a	19.93±1.22 ^a
	OF-2	16.85±1.06 ^a	17.18±1.40 ^a	17.36±0.87 ^a
	OF-5	14.48±0.78 ^b	12.69±1.03 ^b	11.90±0.83 ^b

¹⁾ Values are mean±S.E., n=8

²⁾ LDL(low density lipoprotein) and VLDL(very low density lipoprotein)

³⁾ NC: non-diabetic control, DC: diabetic control,

OF-2: diabetic Opuntia complex C - 2%

OF-5: diabetic Opuntia complex C - 5%

⁴⁾ Values with different superscripts within same columns are significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

따라서 본 연구에서 OF의 급여는 당뇨로 인한 지질대사의 이상을 암시하는 총 콜레스테롤의 증가, LDL과 VLDL의 증가를 완화시키고, 동맥경화지수인 AI를 유의적($p<0.05$)으로 감소시킴으로써 지질대사의 이상으로 인한 혈관합병증을 줄여줄 수 있는 것으로 판단된다.

4. 혈장 중 AST, ALT 함량

당뇨로 인한 간의 생화학적 기능에 미치는 영향을 보고자 간세포 내에 있는 효소인 AST와 ALT의 혈장 함량을 측정하였다(Fig. 2). 간이 손상되면 세포 내에 있던 이 효소들은 간세포 외부로 다량 유출되어 혈액 내의 농도가 증가함으로써 간 손상의 지표로 사용된다(Tawata 등 2000). Hunt 등(1990)의 연구에 의하면 당뇨로 인해 고혈당이 유지되면 포도당 산화를 통해 활성산소 생성이 증가하며, MDA(Malondialdehyde)를 형성함으로써 막 인지질에 세포독성 작용을 일으켜 간세포의 손상을 가져온다.

AST는 NC군(249 IU/ℓ)에 비하여 DC군(383 IU/ℓ)에서 유의적인 증가를 보였고, ALT도 NC군(48 IU/ℓ)에 비하여 DC군(181 IU/ℓ)에서 유의적인 증가를 보였다($p<0.05$). 이는 기존에 보고된 다른 연구들에서 관찰된 바와 같은 경향이였다(Ju JB 2003).

AST의 측정 결과, OF-2군은 DC군에 비하여 유의적인 감소를 보이지 않았으나, OF-5군은 DC군에 비하여 42%의 유의적($p<0.05$)인 감소를 보여 NC군과 비슷한 수준에 도달하였다.

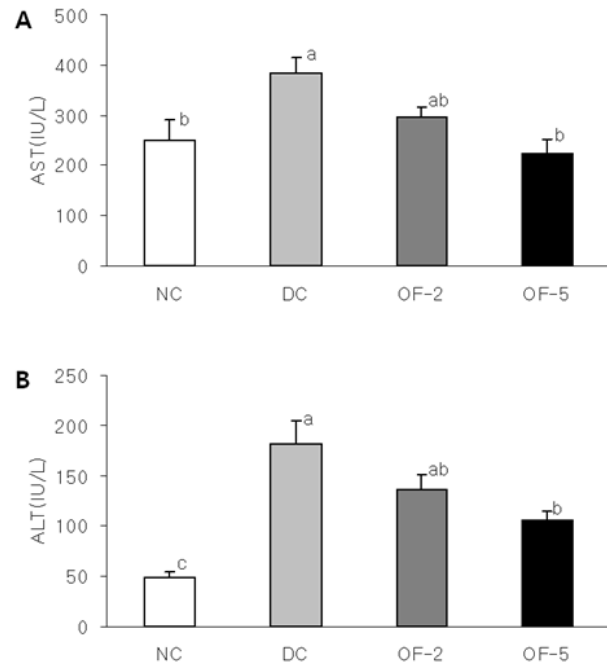


Fig. 2. Comparison of plasma AST (A) and ALT (B) by supplementation of OF in rats for 3 weeks. Values are mean±S.E., n=8, AST(aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic Opuntia complex C - 2%, OF-5: diabetic Opuntia complex C - 5%, Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

또한 ALT의 측정 결과도 AST와 비슷한 경향을 보여 OF-2군은 DC군에 비하여 유의적인 감소를 보이지 않았지만, OF-5군은 DC군에 비하여 42%의 유의적($p<0.05$)인 감소를 보였다(Fig. 2). 이러한 결과에 비추어 보았을 때 5% 급여 수준의 OF 급여가 당뇨로 인한 간 손상을 억제하는 효과를 가져다줄 수 있는 것으로 판단된다.

5. 분변 중 담즙산 함량

체내 콜레스테롤은 콜레스테롤 그 자체뿐만 아니라, 간에서 담즙산으로 되어 담즙 중으로도 배설되는데, 이는 장간 순환을 통해 대부분 재흡수되지만, 그렇지 못한 것은 담즙의 형태로 분변을 통해 배출된다. 그러므로 체내의 콜레스테롤이 얼마만큼 배출되었는지 알아보기 위해서는 분변에서의 담즙산의 측정이 필요하다(Han 등 2004). 분변으로 배출된 담즙산을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 단위 무게 당 변 중 담즙산량은 NC군을 100%로 하였을 때 DC군에서 45%로 유의적으로 감소하였고, OF-2군에서는 64%로 DC군에 근접하는 수준을 나타내었으며, OF-5군에서는 136%로 NC군에 비

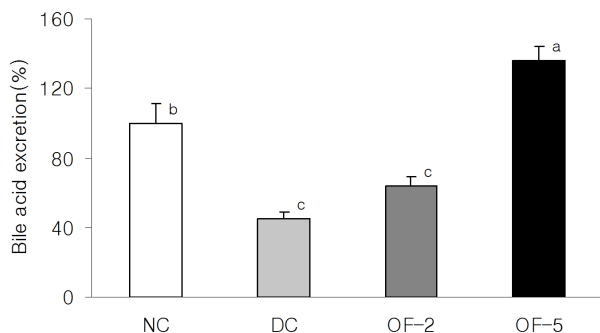


Fig. 3. Effect of OF on fecal bile acid excretion in rats fed experimental diet for 3 weeks. Values are mean±S.E., n=8, NC: non-diabetic control, DC: diabetic control, OF-2: diabetic *Opuntia complex C* - 2%, OF-5: diabetic *Opuntia complex C* - 5%, Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

하여 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 여기서 분변에서의 담즙산의 증가는 체내 콜레스테롤을 담즙산으로 배설시키는데 관여하는 효소 유전인자인 *CYP7A1*(cholesterol 7 α -hydroxylase)를 PCR을 통해서 확인해 볼 필요가 생겼다. 한편으로 식이섬유가 체내의 담즙산과 결합하여 배출을 촉진하고, 담즙산의 재흡수를 방해하여 배출을 촉진한다는 기존 보고에서와 같이 OF의 식이섬유에 대한 기능도 영향을 미친 것으로 해석된다 (Moghadasian & Frohlich 1999).

6. 유전자형 분석

세포에서 요구하는 콜레스테롤에 대한 공급원은 내인성(생합성)과 외인성(LDL)을 생각할 수 있으나, 콜레스테롤 요구량이 낮은 조직은 세포자체의 HMG-CoA-R를 통한 생합성에 의존한다. 그러나, 담즙산을 합성하는 간장과 같은 조직은 생합성과 LDL-R를 통한 LDL 형태로 콜레스테롤을 획득한다. 그리하여, HMG-CoA-R와 LDL-R는 스테롤에 의하여 같은 방향으로 활성의 조절이 이루어진다(Choi & Lee, 1992).

HMG-CoA-R는 NC군에 비하여 DC군은 6%, OF-2군은 24%, OF-5군은 30% 증가하였다(Fig. 4A).

LDL-R는 NC군에 비하여 모두 감소하였으나, DC군과 비교할 때 OF-2군은 15%, OF-5군은 18% 증가하였다(Fig. 4B).

*CYP7A1*은 콜레스테롤을 담즙산으로 합성하여 변으로 배설하여, 혈중 콜레스테롤 수준을 낮추고, 분변 중의 담즙산 함량을 증가시킨다. DC군을 제외한 NC군과 OF-2군과 OF-5군은 유의적($p < 0.05$)인 증가를 보였다(Fig. 4C).

HMG-CoA-R와 LDL-R를 비교할 때 같은 경향을 보였으며, 간 조직에서의 HMG-CoA-R와 LDL-R의 증가는 몸의 조직세포에서 간 조직으로 콜레스테롤이 유입되었다는 것을 의미

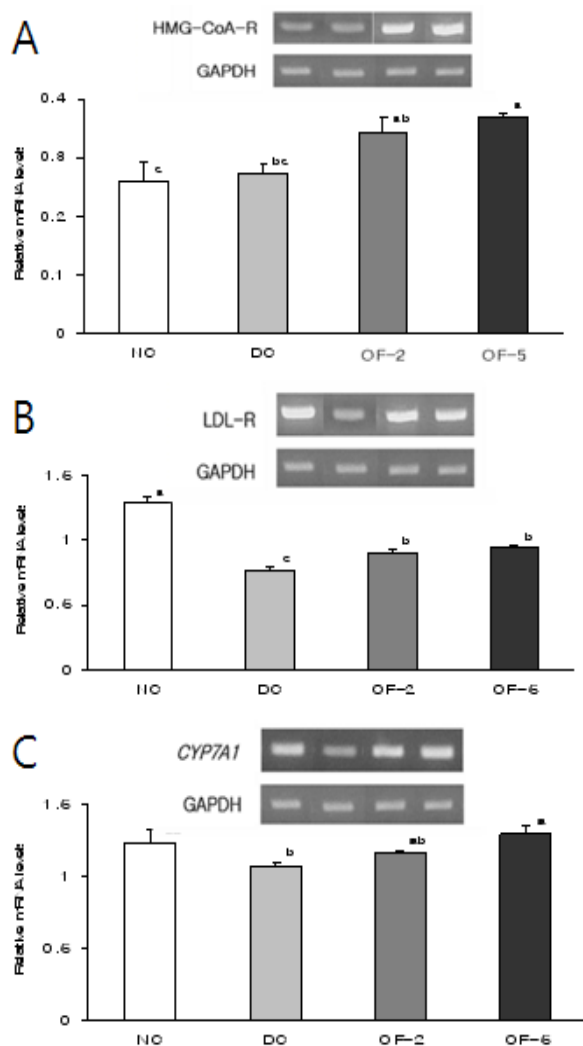


Fig. 4. Effect of the OF on HMG-CoA reductase (A), LDL-receptor (B) and *CYP7A1* (C) mRNA expression. Values are mean±S.E., n=8, GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), HMG-CoA-R(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase), LDL-R (Low density lipoprotein receptor), *CYP7A1*(7 α -hydroxylase), NC, non-diabetic control; DC, diabetic control; OF-2, diabetic *Opuntia complex C* - 2%; OF-5, diabetic *Opuntia complex C* - 5%, Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

한다. 또한 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 합성하여 분비하는 양이 많음을 알 수 있는 결과이며, *CYP7A1*의 함량을 보면 많은 콜레스테롤이 담즙산으로 합성된 것을 알 수 있다. OF는 혈중 콜레스테롤을 담즙산으로 합성하여 변으로 배설시켜 혈액의 콜레스테롤 함량을 낮추어, 제1형 당뇨병에서 지질대사를 개선하는 것을 알 수 있었다.

요약 및 결론

제1형 당뇨병이 발병할 경우 지질 대사에 이상이 발생하여 동맥 경화 및 이로 인한 합병증이 발생한다. 지질 대사 이상과 합병증을 개선하기 위해 당뇨에 효과가 있는 것으로 알려진 손바닥선인장을 주재료로 하여 다른 천연물과 배합한 복합물(OF)의 지질대사 개선 효과를 알아보았다.

1. OF의 급여는 혈당과 지방 대사를 개선시켜, 혈장 총 콜레스테롤, LDL, VLDL, 중성지방과 유리지방산을 감소시켰다.

2. 간 조직에서 HMG-CoA-R와 LDL-R의 증가를 보였고, 콜레스테롤을 담즙산으로 합성하는 *CYP7A1*을 증가시켰고, 이는 분변 중 담즙산 함량의 증가와 일치하여 혈장 콜레스테롤이 담즙산의 형태로 배설되어 감소하였음을 확인하였다.

3. OF 급여를 통해 ALT, AST의 감소를 알 수 있었다.

이상의 결과들은 손바닥선인장 복합물인 OF가 제1형 당뇨 모델인 STZ으로 당뇨를 유발한 쥐에서 혈중 콜레스테롤을 간으로 운반하고, 간에서 담즙산으로 합성하여 배설시켜 혈중 콜레스테롤을 낮췄고, 이 결과로 지질대사를 개선하는 효과가 있음을 보여주었다.

References

- Choi YG, Lee TH. 1995. Diabetes Mellitus and Hyperlipidemia. Medical Publisher. Seoul. Korea
- Choi YS, Lee SY. 1992. Serum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21:580-593
- Fausa O, Skalhogg BA. 1974. Quantitative determination of bile acid and their conjugation using thin-layer chromatography and a purified 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Scan J Gastroent* 9:249-254
- Fernandez ML, Lin EC, Treio A, McNamara DJ. 1992. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J Nutr* 122:2330-2339
- Furuse M, Kimura C, Mabayo RT, Takahashi H, Okumura J. 1993. Dietary sorbose prevents and improves hyperglycemia in genetically diabetic mice. *J Nutr* 123:59-65
- Giron MD, Sanchez F, Hortelano P, Periago JL, Suarez MD. 1999. Effects of dietary fatty acid on lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 48:455-460
- Goldberg RB. 1981. Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 4:561-572
- Han KH, Sekikawa M, Shimada KI, Saski K, Ohba K, Fukushima M. 2004. Resistant research fraction prepared from kintoki bean affects gene expression of genes associated with cholesterol metabolism in rats. *Exp Bio Med* 229:787-792
- Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. 1990. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39:1420-1424
- Ju JB. 2003. Effects of herbal extracts on blood glucose and enzyme activity in alloxan-induced diabetic rats. MS Thesis. Paichai Uni. Daejeon. Korea
- Kim SJ. 2004. The Effects of exercise and taurine supplementation on blood glucose, insulin, serum lipids and mtDNA content in STZ-induced diabetic rats. Ph. D. Dissertation. Pusan National Uni. Busan. Korea
- Lee SZ, Lee HS. 1998. Changes in plasma lipid pattern in streptozotocin-induced diabetic rats. A time course study. *Korean J Nutr* 32:767-774
- Lee TH. 1999. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Food Industry and Nutrition* 4:61-65
- Lim SJ, Choi SS. 1997. The effect of *Tricosanthes kiliouii* Max. subfractions on the insulin activity in streptozotocin induced diabetic rats and their acute toxicity. *Korean J Nutr* 30:25-31
- Moghadasian MH, Frohlich JJ. 1999. Effect of dietary phyosterol on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical experiment evidence. *Am J Med* 107:588-594
- Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 28:56-63
- Rosenstock JG, Vega GL, Raskin P. 1988. Effect of intensive diabetes treatment on low-density lipoprotein apolipoprotein B kinetics in type I diabetes. *Diabetes* 37:393-397
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 1989. Beyond cholesterol. Modification of low-density-lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924
- Tawata M, Ikeda M, Kodama Y, Aida K, Onaya T. 2000. A type 2 diabetic patient with liver dysfunction due to human insulin. *Diabetes Res Clin Pract* 49:17-21
- Urano S, Hoshi-hashizume M, Tochigi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. 1991. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26:58-61
- Vergès B. 2009. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 35:353-360
- West CE, Beynen AC, Terpstra AHM, Scholz KE, Carroll KK,

- Woodward CJH. 1983. The nature of dietary protein and serum cholesterol. *Atherosclerosis* 46:253-256
- Xie JT, Aung HH, Wu JA, Attel AS, Yuan CS. 2002. Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in ob/ob mice. *Am J Clin Med* 30:187-194
- Yadav UCS, Moorthy K, Baquer NZ. 2004. Effects of sodium-orthovanadate and *Trigonella foenum-graecum* seeds on hepatic and renal lipogenic enzymes and lipid profile during alloxan diabetes. *J Biosci* 29:81-91
- Yang KM, Shin SR, Jang JH. 2006. Effect of combined extract of safflower seed with herbs on blood glucose level and biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:150-157
- Yoon JA, Lee SJ, Kim HK, Son YS. 2011. Ameliorating effects of a nopal (*Opuntia ficus-indica*) complex on blood glucose in *db/db* mice. *Food Sci Biotechnol* 20:255-259
- Yoon JA, Son YS. 2009. Effects of fruits and stems of *Opuntia ficus-indica* on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:146-153
- Yoon JA, Son YS. 2009. Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes B(OCB) on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food & Nutr* 22:48-56
- Yoon JA. 2013. Effects of *Opuntia ficus-indica* on lipid metabolism in the *db/db* mouse. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:861-868
- Zhang R, Zhou J, Jia Z, Zhang Y, Gu G. 2004. Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide and alloxan induced diabetic rats and its mechanism. *J Ethnopharmacol* 90:39-43

접 수 : 2013년 8월 13일
 최종수정 : 2013년 9월 5일
 채 택 : 2013년 9월 9일