

스트렙토조토신 유발 당뇨 쥐의 산화스트레스에 대한 매생이 추출물의 신장 보호 효과

남미현 · 구윤창 · 홍충의 · 양성용 · 김세욱 · 정혜림 · 이 화 ·
김지연 · 한아람 · 손원락 · 표민철 · 이광원*
고려대학교 생명공학부

In vivo Study of the Renal Protective Effects of *Capsosiphon fulvescens* against Streptozotocin-induced Oxidative Stress

Mi-Hyun Nam, Yun-Chang Koo, Chung-Oui Hong, Sung-Yong Yang, Se-Wook Kim, Hye-Lim Jung, Hwa Lee,
Ji-Yeon Kim, Ah-Ram Han, Won-rak Son, Min-Cheol Pyo, and Kwang-Won Lee*

Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Science & Biotechnology, Korea University

Abstract In this study, we evaluated the effect of *Capsosiphon fulvescens* extract (CFE) and its active compound, pheophorbide A (PhA), on diabetic kidney failure. Diabetes mellitus (DM) was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 40 mg/kg body weight (BW)). After a week, the rats were orally administered CFE (4 and 20 mg/kg BW) or PhA (0.2 mg/kg BW) once a day for 9 weeks. After scarification, renal tissue samples were collected for biochemical and histochemical analyses. Our study showed that the treatment with CFE and PhA significantly decreased lipid peroxidation level and the activities of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase ($p < 0.05$), but it increased glutathione level and the activities of glutathione reductase, superoxide dismutase, and catalase in the renal tissues ($p < 0.05$). The CFE- and PhA-treated rats with DM showed improved histochemical appearance and decreased abnormal glycogen accumulation. Therefore, we suggest that PhA-containing CFE could exert renal protective effects against STZ-induced oxidative stress.

Keywords: *Capsosiphon fulvescens*, streptozotocin, diabetic rats, oxidative stress, antioxidant enzyme, renal protective effects

서 론

보건 복지부와 질병 관리본부에서 우리나라 30세 이상 성인을 대상으로 시행한 국민건강영양조사에 따르면, 성인의 당뇨병 유병률은 10%선이며, 성인 10명중 2명이 공복혈당장애로 잠재적 당뇨병 환자라고 발표하였다. 또한, 2050년도 우리나라 당뇨병 환자수는 약 600만명으로 예상 된다고 보고하였다(1). 당뇨병 환자의 가장 큰 문제는 고혈당으로 인한 합병증이며 망막, 혈관, 신장 등에서 장애를 초래할 수 있다(2). 당뇨병 합병증의 정확한 기전은 규명되지 않았으나, 고혈당에 의한 산화 스트레스가 가장 중요시 되고 있다(3,4). 한편, 스트렙토조토신(Streptozotocin; STZ)에 의해 유발되는 제 1형 당뇨병은 췌장의 랑게르한스섬에서 인슐린을 생산하는 β -세포의 파괴로 발병된다(5). 또한, STZ를 반복해서 저농도(40 mg/kg body weight (BW))로 투여할 경우 베타세포의 부분적인 파괴를 일으키고, 이것은 인슐린 결핍과 염증을 유발한다고 알려져 있다(6). 정상적인 상태에서는 자유 라디칼의 생성과

제거가 균형을 이루고 있으나, 고혈당에 의한 산화적 스트레스의 증가는 자유 라디칼이 세포막에 작용하여 지질 과산화물을 생성하고 항산화 효소계의 활성이 감소되어 세포 기능을 손상시킨다. 또한 지속적인 고혈당 상태로 인해 체내에서 비효소적 당화과정이 진행되고, 망막과 신장의 사구체에서 심각한 2차적인 미세혈관 병리가 발생된다(7). 특히 당뇨병성 신장 손상은 병리학적으로 사구체 및 세뇨관의 비대, 세포외 기질의 축적 등이 관찰되며, 당단백질의 분포 이상으로 기저막이 두꺼워지고 투과성이 증가하여 소변으로 혈중 단백질이 다량 손실되고 혈장 내 단백질의 감소로 부종 등의 증상을 초래한다(8,9). 당뇨의 치료법으로는 운동요법과 식이요법, 약물요법이 있으나, 현재 사용되는 약물요법의 경우는 대부분 부작용으로 인해 사용에 제약이 있으며(10), 이에 천연물을 이용한 식이요법에 알맞은 기능성 물질의 탐색이 활발히 이루어지고 있다. 녹조류 갈파과과 매생이(*Capsosiphon fulvescens*, CF)는 남해안이나 서해안에 분포하며 채취시기에 따라 일반성분 및 무기질 함량 등에 차이가 있지만(11), 약 50%의 식이섬유와 35%의 단백질을 함유하고 있다. 특히 필수 아미노산 함량은 다른 해조류에 비하여 높고, 철분이나 셀레늄과 같은 무기질, 비타민 A, C 및 오메가-3계열의 지방산도 다량 함유하고 있어서(12) 영양학적으로 다른 해조류보다 우수하며, 중성지방과 콜레스테롤 저하(13) 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 이에 매생이 에탄올 추출물과 매생이 유래 기능성 물질인 pheophorbide A를 STZ로 유도된 당뇨 쥐에 투여함으로써 신장 보호 효과를 확인하기 위하여 연구를 수행하였다.

*Corresponding author: Kwang-Won Lee, Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
Tel: 82-2-3290-3027
Fax: 82-2-927-1970
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Received June 3, 2014; revised July 3, 2014;
accepted July 7, 2014

재료 및 방법

시험 물질

매생이(*Capsosiphon fulvescens*, CF)는 전라남도 장흥산의 생물을 구입하였다. 수돗물로 3회 세척 후 이물질과 염분을 제거하고 동결건조 하였다. 건조된 매생이는 70% 주정 에탄올을 이용하여 환류 냉각하여 추출한 후, Whatman No. 2 (Clifton, NJ, USA)를 이용하여 여과하였다. 여액은 감압 증류한 다음 동결건조 하여 매생이 주정 추출물(CFE)을 얻었으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균수에 현탁하여 실험에 사용하였다.

시약 및 재료

Citric acid, sodium citrate, streptozotocin, acarbose, glucose, Xanthine, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, L-Lactate dehydrogenase, Xanthine oxidase, hydrogen peroxide, Potassium dichromate, GSH reductase (Glutathione reductase from baker's yeast)는 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, pheophorbide A (PhA)는 Santa cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 모든 시약은 특급 및 일급품을 사용하였다.

실험 동물

동물 실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 심의를 받은 후 진행 하였다(승인 번호 KUIACUC-2013-142). 시험 동물은 5주령의 Sprague-Dawleyrats (160-200 g)을 (주)셀타코(Osan, Korea)에서 구입하였다. 실험 동물의 사육은 특정 병원균 부재(specific pathogen free, SPF)상태를 유지하기 위하여 ventilation unit가 장착된 barrier system에서 사육 상자에 1마리씩 분리 사육하였으며, 사육 조건은 23±3°C, 습도 50±10%, 조명 시간 12시간(08:00 점등-20:00 소등), 조도 150-300 Lux, 환기회수 10-20회/hr를 유지하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

당뇨 유발 및 실험군

실험에 사용한 쥐는 12시간 동안 절식시킨 다음 STZ를 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5)에 녹여 공복 시 혈당을 확인 후 시험 물질을 40 mg/kg BW의 용량으로 복강 투여하였다. 한달 간의 유도기간 결과 모든 그룹에서 400 mg/dL의 공복 시 혈당을 확인 후 시험물질 투여를 시작하였다. 또한, 동물 섭취량을 사람으로 전환하기 위해서는 체표면적을 기초하여 전환시키는데 이 때 적용되는 수치를 Km factor라고 한다. 성인 60 kg의 Km은 37, 랫드에 대한 Km은 6이며(14), 이러한 값을 이용하여 얻은 인체에 대한 섭취량을 고려했을 때 저농도 CFE 투여군(4 mg/kg BW, CL)에 해당하는 인체 등가 용량은 CFE 40 mg으로 매생이 생물 4.6 g에 해당한다. 2010년 국민건강영양조사에 따른 해조류 1일 평균 섭취량은 4.6 g으로 매생이 저농도 투여군에 상응하는 양이며, 이보다 4배 높은 20 mg/kg BW를 고농도 CFE 투여군으로 하였다. 실험군은 총 6개로, 정상대조군(Con), 당뇨 유발군(STZ), 당뇨 유도 후 acarbose 0.2 mg/kg BW 투여군(AC), 저농도 CFE 투여군(4 mg/kg BW, CL), 고농도 CFE 투여군(20 mg/kg BW, CH), 고농도 CFE에 함유된 농도인 0.2 mg/kg BW의 PhA 투여군으로 군 당 6마리로 하여 9주 동안 시행하였다. 투여 완료 후 랫드를 CO₂로 마취시킨 후 희생시켜 혈액 및 신장 조직을 적출하였다. 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 한 후 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

혈청 BUN, Creatinine 측정

채혈한 혈액 일부를 응고 촉진제가 들어있는 진공 시험관(Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria)에 주입하고 15-20분간 상온에 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 혈청으로 Photometer 5010 (Robert Riele GmbH & Co KG, Staufen, Germany)를 이용하여 546 nm 파장에서 BUN을, 505 nm 파장에서 creatinine을 측정하였다.

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 측정

조직 0.1 g을 칭량하고 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)을 첨가하여 균질화한다. 그 후 원심분리 한 상등액을 취하여 시료로 사용하였다. 조직 상등액에 TBA reagent (30% TCA, 1.5% TBA, 10 mg/mL BHT)를 넣어 100°C에서 20분간 가열하였다. 상온에서 식힌 후, 반응액을 10,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 상등액을 excitation 530 nm/emission 590 nm의 파장에서 spectrofluorometer (VICTOR3™, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 형광도를 측정하였다. 이 후 원심 분리된 침전물을 1 N NaOH를 넣어 녹인 후 단백질 정량하였으며, 결과값은 1,1,3,3-tetraethoxy-propane의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) 당량의 표준곡선을 계산한 후 이에 따른 측정치를 MDA 농도로 표기 하였다.

GSH, GSSG 함량 측정

GSH 함량 측정은 신장 조직 0.1 g에 50 mM NEM 1 mL를 첨가하고 마쇄한 뒤 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. 상등액에 0.1 M potassium phosphate buffer (PB, pH 7.4)와 100 mM DTNB를 혼합하고 37°C에서 5분간 반응 후 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 측정하였다. 조직 분쇄 상등액 대신 GSH 표준 물질을 농도별로 측정하여 얻은 검량곡선을 이용하여 조직의 GSH 함량을 측정하였다.

GSSG 실험은 조직 0.1 g에 5% sulfosalicylic acid 1 mL를 첨가하고 마쇄한 뒤 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. 0.3 mM NADPH와 6 mM DTNB를 혼합한 후 30°C에서 약 15분간 정치하여 반응액을 제조한다. 조직분쇄 상등액에 2-vinylpyridine, triethanolamine을 넣고 실온에서 1시간 동안 정치한 후 만들어놓은 반응액과 1 U/mL glutathione reductase를 첨가하고 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSSG 표준물질을 농도별로 측정하여 얻은 검량곡선을 이용하여 조직의 GSSG함량을 측정하였다. 또한 Bicinchoninic acid (BCA) assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다.

Glutathione Peroxidase (GPx) 활성 측정

시험액은 GSSG 실험과 동일한 상등액을 사용하였으며, GPx의 활성도는 기질과 반응하여 소모된 glutathione을 환원형으로 되돌리는데 필요한 NADPH의 양을 340 nm에서 측정하였고, 분 당 1 mmol NADPH를 산화시키는 g protein내 효소의 활성으로 정의 하였다.

Glutathione reductase (GR) 활성 측정

GR 시험액은 신장 조직을 homogenizer를 이용하여 1 mM EDTA를 함유한 0.1 M PB (pH 7.4)에서 마쇄한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액과 1 mM EDTA를 함유한 0.2 M PB (pH 7.5)에 3 mM DTNB를 함유한 10 mM PB, 증류수, 2 mM NADPH, 20 mM GSSG를 혼합하여 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 1분 간격으로 5분간 412 nm에서 측정하였다.

Glutathione-S-transferase (GST) 활성 측정

실험에서는 GST에 의해 GSH와 CDNB가 GS-CDNB로 변환되는 원리를 이용하였다. GR 실험에 사용한 동일한 상등액과 1 M PB (pH 6.5), H₂O, 에탄올에 녹인 40 mM CDNB, 20 mM GSH를 혼합한 후 5분 동안 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 측정하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성 평가

SOD에 의해 O₂·가 소거된 정도를 바탕으로 SOD의 활성을 간접적으로 측정하였다. 조직 상등액과 1 M PB (pH 6.5), 0.1 M xanthine, 1 mM NADH, LDH enzyme, 5 mM EDTA를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 0.1 unit xanthine oxidase를 첨가하여 340 nm에서 1분 간격으로 5분동안 흡광도를 측정하였다.

Catalase (CAT) 활성 평가

CAT는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 환원하는 효소로써, dichromate가 H₂O₂와 만나서 열을 가했을 때 chromic acetate로 환원되어 탈색하는 원리를 이용하였다. 조직 상등액과 50 mM PB를 혼합한 뒤 0.4 M의 H₂O₂ 200 µL 첨가하여 1분간 반응시켰다. 그 후 5% K₂Cr₂O₇와 acetic acid 혼합액을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열하였으며 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조직병리학적 검사

신장 조직을 2 등분 한 뒤 4%의 paraformaldehyde (pH 7.4)를 이용하여 24시간 동안 고정시킨 후 파라핀에 포매한 다음 microtome을 사용하여 5 µm 두께로 세절하여 periodic acid-Schiff (PAS) 시약으로 염색하여 광학현미경(CX-40, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

통계 처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 실험군 간의 통계학적 분석은 Sigma-Stat 3.5 (Jandal Co., San Rafael, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시하였으며, 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 의 수준에서 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 생화학적 수치 변화

당뇨병성 신장 손상의 지표로서 혈중 요소 질소(BUN)와 크레아티닌(Cr)을 측정하는데, BUN은 신장 이외에도 다른 인자의 영향을 받기 쉬우나 민감도가 높아 조기 진단에 사용될 수 있고 (15), Cr은 식사나 운동 등의 외적 영향을 받지 않고 일정한 농도로 유지되며, 사구체에서 여과 되더라도 세뇨관에서 재흡수되거나 대사되지 않고 소변으로 배출 되는 점에서 신장 손상 지표로서 특이성이 높으며 중증도의 병태 파악에 유용하다(16). 복대 동맥으로부터 채혈하여 혈청 내 BUN을 측정한 결과 대조군(15.84±2.42 mg/dL)에 비하여 STZ군(47.93±5.20 mg/dL)에서 크게 증가하였다. 또한 정상대조군인 AC군(37.2±2.08 mg/dL)은 다소 낮게 관찰 되었으며, CL, CH, Pha군(48.18±9.10, 51.85±3.36, 50.89±4.42, 0.50±0.05 mg/dL)에서는 STZ군과 유의성이 없었다(Fig. 1A). 당뇨 유발 그룹들에서의 BUN 증가는 인슐린 부족으로 인해 당이 에너지로 쓰이지 못해 체내에 저장된 단백질의 분해에 따른 간의 요소 합성 및 당뇨로 인한 탈수 상태에서 높아진 것으로 판단된다. 혈중 Cr의 농도 변화는 Con군(0.38±0.02 mg/dL)

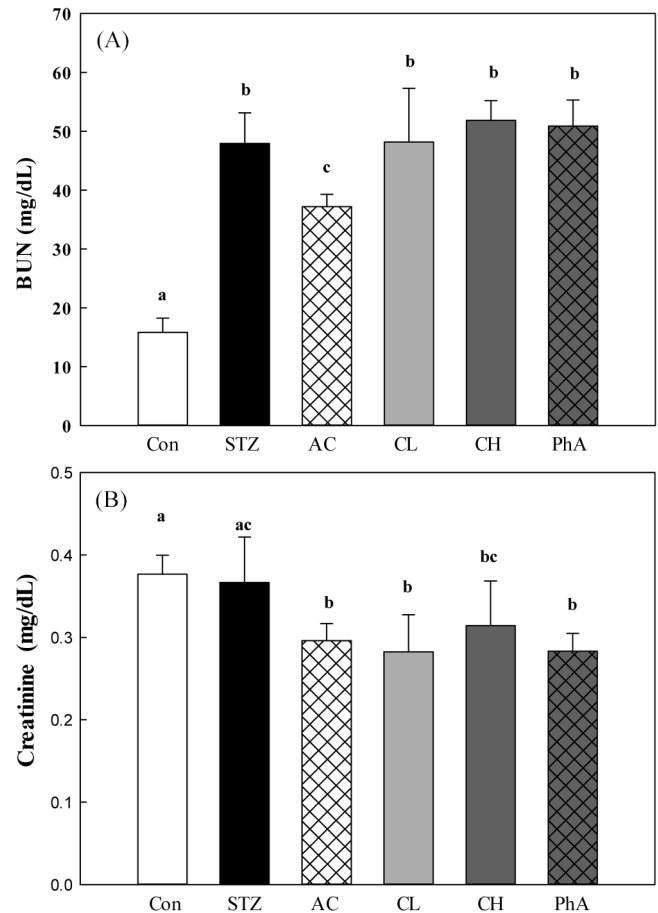


Fig. 1. Effect of CFE and Pha on serum biochemical parameters of STZ-induced rat for 9 weeks. (A) Blood urea nitrogen (BUN), (B) creatinine. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg BW), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg BW), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg BW), Pha; pheophorbide A treated diabetic group (0.2 mg/kg BW). Bars with different letters (a, b, c) are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

과 비교하여 모든 군에서 약간 감소하는 경향을 보였으나, 투여군 간의 유의적 차이는 없었다(Fig. 1B). Cr은 신장과 간에서 생합성되며, 크레아티닌산의 형태로 존재하다가 근수축 에너지로 사용되기 위해 ATP에 의해 크레아티닌이 되어 신장을 통해 배출된다고 알려져 있다(17). 크레아티닌 농도는 근육량에 비례하며, 당뇨 유발 시 체중이 감소함에 따라 근육량 또한 감소하여 Cr의 농도가 줄어든 것으로 생각된다. 또한, 당뇨로 인한 만성 신부전의 경우 사구체 여과율이 감소하여 혈중 Cr의 농도가 높아진다고 알려져 있으나, 본 실험의 결과 Con군과 STZ군 간의 유의적 차이가 없는 것으로 미루어 보아 만성적인 합병 증상은 나타나지 않은 것으로 볼 수 있다.

신장 조직 중의 과산화 지질

신장에서의 MDA 농도는 Con군(0.05±0.00)에 비하여 STZ군(0.19±0.04)에서 3.5배 높았으며 CL, CH군(0.05±0.02, 0.08±0.02)에서 STZ군에 비해 크게 감소하는 것을 확인하였다. 또한, Pha군(0.12±0.01)도 정상 대조군인 AC군(0.14±0.03) 보다 더 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 당뇨 유발 시 고혈당에 의한 산화

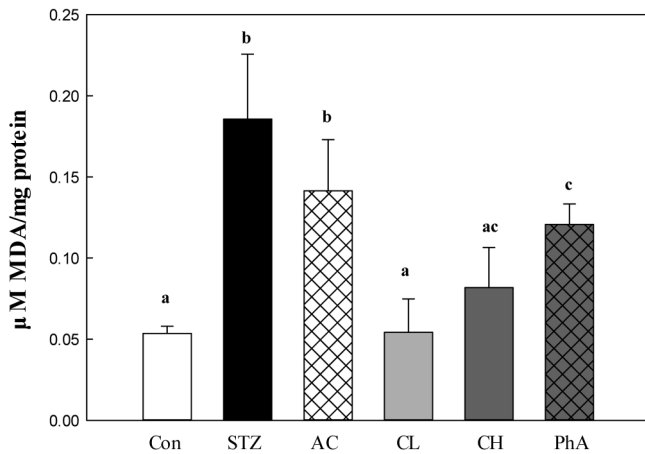


Fig. 2. Effects of CFE and PhA on MDA contents of kidney tissue in streptozotocin (STZ)-induced rat for 9 weeks. At the end of the treatment, the kidneys were removed, homogenized, and centrifuged to collect the tissue supernatant. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg BW), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg BW), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg BW), PhA; phephorbide A treated diabetic group (0.2 mg/kg BW). Values are means±SD ($n=6$ for each group). Bars with different letters (a, b, c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

스트레스는 신장 조직에서 지질 과산화물을 초래한다는 연구 결과가 다수 보고되었으며(18), 샘플 투여군에서 과산화물이 크게 감소하는 것으로 보아 CFE와 PhA의 항산화 작용을 확인할 수 있었다.

GSH/GSSG 함량 측정

세 가지 아미노산이 결합된 glutathione (glycine-glutamine-cysteine)은 환원 형태(GSH)에서는 시스테인의 thiol group이 전자를 제공하고 자신은 다른 활성형 glutathione과 반응하여 산화 형태(GSSG)를 형성하며 체내에서 자유 라디칼을 소거하고 단백질이나 DNA의 합성, 효소 활성의 조절 등에 관여 한다(19). Con군(135.5 ± 14.5 μmol GSH/g protein)에 비해 당뇨가 유발된 STZ군(94.7 ± 10.3 μmol GSH/g protein)에서 GSH가 감소하였다. 이는 신장 조직에서 STZ에 의해 유발된 산화스트레스로 인해 조직 내 GSH가 산화되어 GSSG로 바뀌면서 GSH가 많이 소모된 것으로 판단된다(Fig. 3A). 매생이 추출물을 처리한 CL군(119.0 ± 10.8 μmol GSH/g protein)과 CH군(122.2 ± 16.2 μmol GSH/g protein)은 STZ군에 비하여 GSH 함량이 증가하였으며, PhA군(139.6 ± 24 μmol GSH/g protein)과 AC군(132.2 ± 30.1 μmol GSH/g protein)은 Con군 수준으로 GSH 함량이 증가하였다(Fig. 3A). 한편, 신장의 GSSG 함량은 정상 대조군과 당뇨 유발군 사이의 유의적 차이가 없었다(Fig. 3B). 건강한 상태의 조직에서는 총 glutathione 가운데 GSH가 90% 이상이고 GSSG가 10% 미만이나, 산화스트레스를 받으면 GSH/GSSG 비율이 감소하게 된다. 신장의 GSH/GSSG 비는 Con군에 비해 STZ군에서 약 30% 감소하였으나, AC군과 CH군에서 정상 수준으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 CL군과 PhA군은 STZ에 비해 유의적으로 증가하였다(Fig. 3C). 실험 결과 CFE와 PhA는 산화스트레스에 의한 GSH 함량이 감소하는 것을 막아 당뇨 유발 시 신장 손상에 보호 효과가 있다고 판단된다.

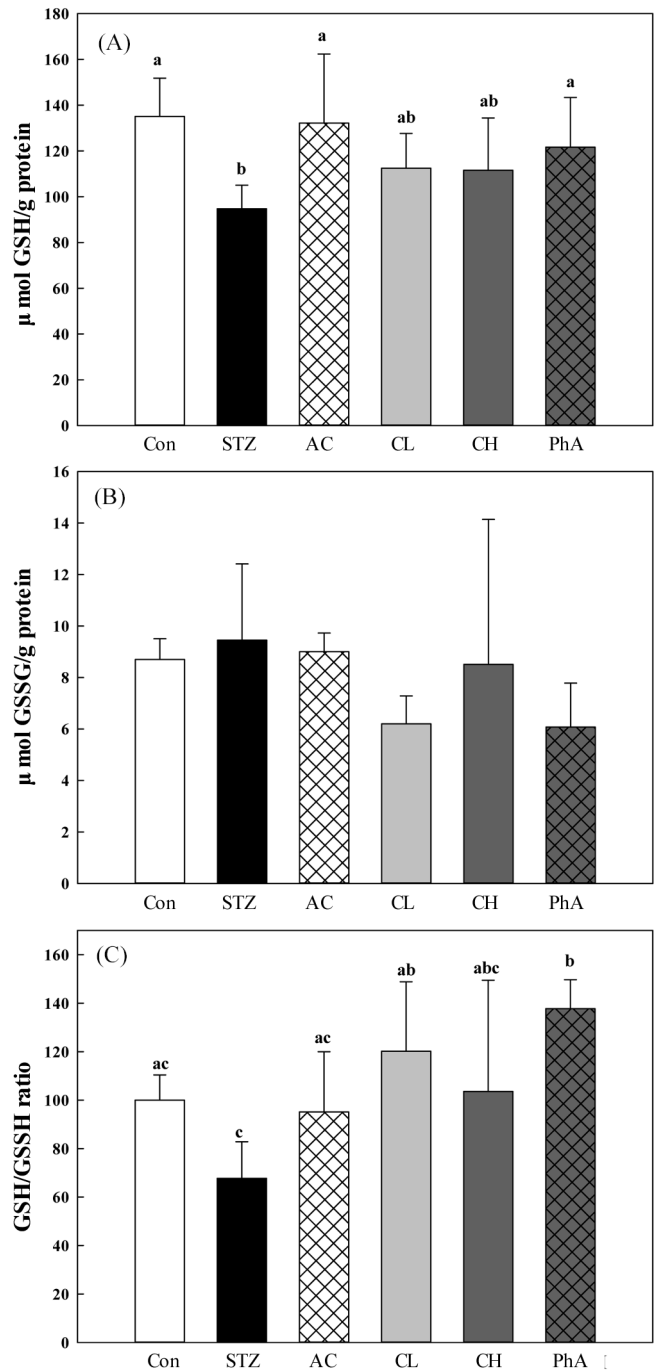


Fig. 3. Effects of CFE and PhA on GSH, GSSG contents and GSH/GSSG ratios of kidney tissue in streptozotocin (STZ)-induced rat for 9 weeks. At the end of the treatment, the kidneys were removed, homogenized, and centrifuged to collect the tissue supernatant. (A) renal GSH contents, (B) renal GSSG contents and (C) GSH/GSSG ratio. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg BW), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg BW), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg BW), PhA; phephorbide A treated diabetic group (0.2 mg/kg BW). Values are means±SD ($n=6$ for each group). Bars with different letters (a, b, c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

GPx, GR 및 GST 활성도 평가

GPx는 생체 내에서 발생하는 과산화수소나 지질 과산화물을

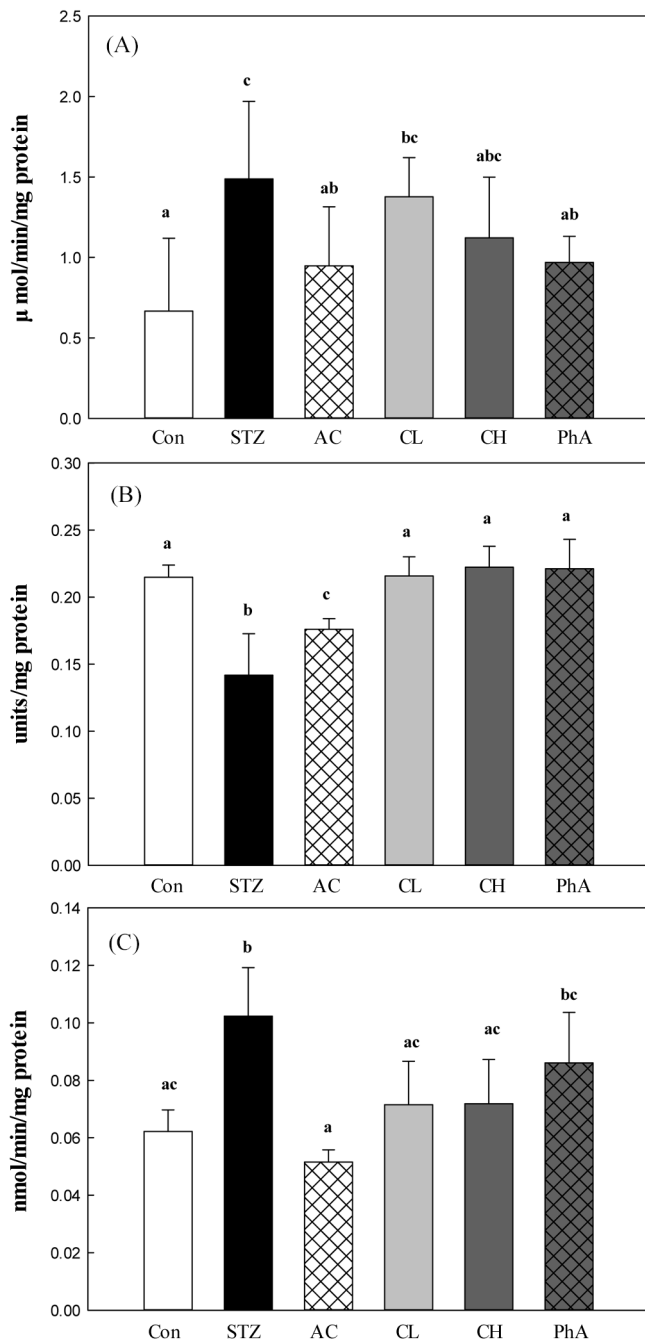


Fig. 4. Activities of GPx(A), GR(B), and GST(C) in kidney of AC, CFE, and PhA treated STZ-induced diabetic rats. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg BW), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg BW), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg BW), PhA; pheophorbide A treated diabetic group (0.2 mg/kg BW). Results are expressed as means±S.D. Data are analyzed by ANOVA (duncan's method). Bars with different letters (a, b, c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

제거하는 효소로써, GSH를 GSSG로 전환시킴으로써 과산화물을 물과 산소로 분해하여 체내에서 제거하는 역할을 한다. 신장 조직에서 Con군(0.67 ± 0.45 µmol/min/mg protein)에 비해 STZ군(1.49 ± 0.48 µmol/min/mg protein)에서 GPx활성이 두 배 이상 증가한 것을 볼 수 있다. 이는 STZ에 유도된 당뇨 쥐의 신장 조직에 많은

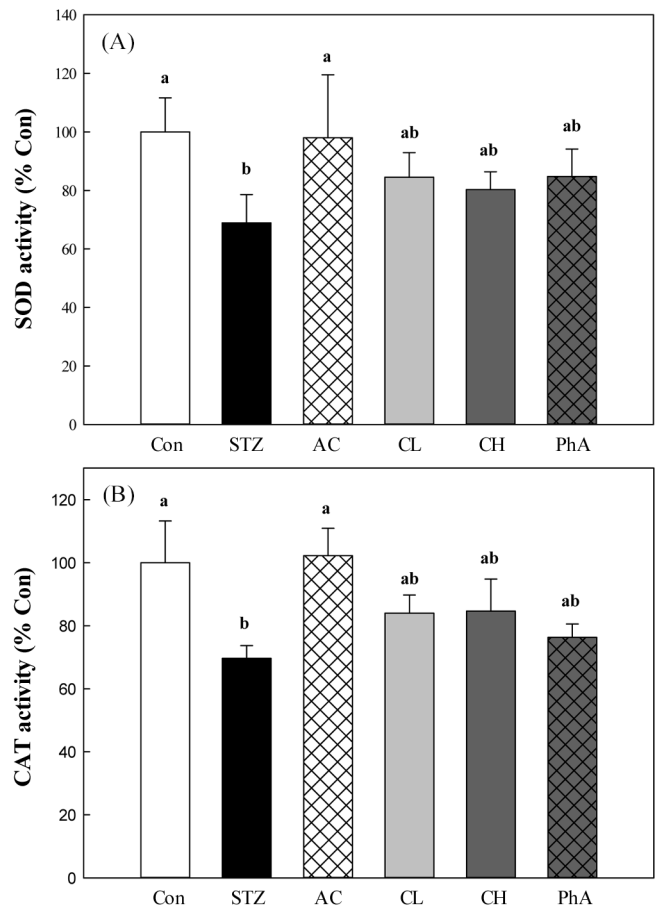


Fig. 5. Effects of CFE and PhA on renal SOD and CAT activities of STZ-induced rat for 9 weeks. (A) Renal SOD activity and (B) renal CAT activity. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg BW), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg BW), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg BW), PhA; pheophorbide A treated diabetic group (0.2 mg/kg BW). Bars with different letters (a, b, c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

양의 과산화물이 축적되어 있으며 이를 소거하기 위해 GPx의 활성이 높아졌을 것이라 생각된다. STZ군에 비해 CL군(1.38 ± 0.24 µmol/min/mg protein)과 CH군(1.12 ± 0.38 µmol/min/mg protein)은 농도 의존적으로 활성이 감소하였으며, CH군과 AC군(0.95 ± 0.37 µmol/min/mg protein), PhA군(0.97 ± 0.16 µmol/min/mg protein)은 GPx의 활성을 정상 수준으로 완화시킨 것으로 확인하였다(Fig. 4A).

GR은 생체 내 GSH의 항산화 작용에 의해 생성된 GSSG를 NADPH를 소모하면서 GSH로 환원시키는 작용을 한다(19). GR은 직접적인 환원 성분으로 작용하여 조직 내 과산화물을 제거할 뿐 아니라, 조직의 보호에 중요한 GSH의 생산에 관여를 하는 중요한 효소이다. 본 실험에서 Con군에 비해 STZ군의 GR 활성은 34% 감소하였으나, AC군에서 STZ군에 비해 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한, CL군과 CH군은 PhA군은 GR 활성이 정상 수준으로 회복 되는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이와 같은, GR의 활성 증가는 GSH 생성과 함께 신장에서 항산화 효과 및 조직보호 활성을 나타내는 것으로 판단되며, 본 실험에서 조직 내 GSH/GSSG의 함량과도 일치하는 경향을 나타내었다.

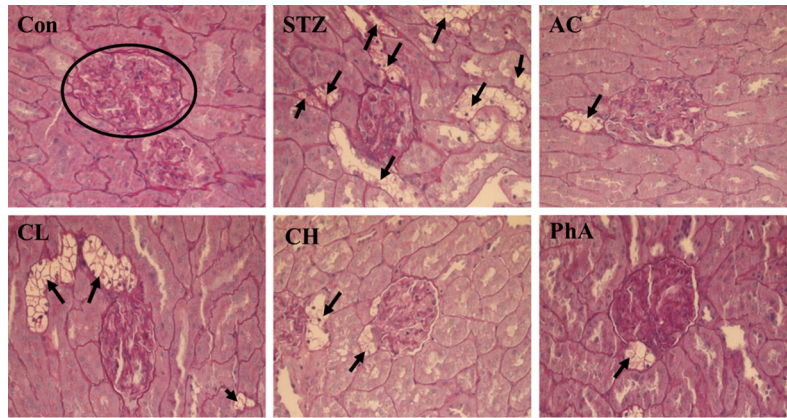


Fig. 6. Histological finding with PAS staining of STZ-induced rat kidney. A photomicrograph of the kidney showing abnormal glycogen accumulation in a renal tubular cells (arrow). Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg BW), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg BW), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg BW), PhA; pheophorbide A treated diabetic group (0.2 mg/kg BW). The kidneys were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in cold polymerizing resin, and 5- μ m sections were stained with periodic acid-Schiff ($n=6$). Magnification $\times 200$.

GST는 체내에 들어온 발암물질, 알코올, 자유 라디칼 등의 독성물질과 GSH와의 축합 반응을 촉진시키는 역할을 하며, GSH의 thiol 잔기와 결합된 독성 물질은 인체에 무해한 형태 또는 배출되기 쉬운 형태로 변환된다. 신장의 GST 활성은 Con군(62.19 ± 7.53 nmol/min/mg protein)에 비해 STZ군(102.32 ± 16.89 nmol/min/mg protein)이 약 65% 증가하였다. 또한 STZ군에 비하여 CL, CH군(71.48 ± 15.15 , 71.85 ± 15.40 nmol/min/mg protein)은 GST 활성이 각각 10.3, 8.9% 감소하였고, AC군(51.54 ± 4.23 nmol/min/mg protein)의 GST 활성은 75.0%로 크게 감소하였다. 또한 PhA군(86.06 ± 17.58 nmol/min/mg protein)은 STZ 군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다(Fig. 4C). 당뇨 유발 기간이 짧으면 당뇨 유발군의 GST 활성이 낮아지나, 이환 기간이 길어질수록(8주 이상) 당뇨 유발군의 GST 활성이 정상 대조군 보다 높아진다는 연구 결과와 일치한 경향을 보였다(20). CFE와 PhA는 신장 조직에서 일차적으로 과산화물을 포집하고 GSH를 이용하여 체내의 독성 물질을 분해시켜 STZ로 유도된 당뇨로부터 신장 보호 효과를 나타낸다고 생각된다.

SOD 및 catalase 활성도 평가

SOD는 산화적 스트레스에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 효소로서 superoxide anion (O_2^-)을 과산화수소로 전환시키는데 관여한다. 산소 대사를 하는 생물체는 SOD를 통하여 독성이 매우 강한 O_2 로부터 세포 손상을 보호받고 있다(21). 본 실험에서 신장의 SOD 활성은 Con군에 비해 STZ군에서 25.9% 감소하였고, AC군은 STZ군에 비해 16.9% 증가하였다. 또한, CL과 CH군은 STZ군에 비해 각각 4.5, 6.9% 증가하였고, PhA군은 6.0% 증가하였다(Fig. 5A).

CAT는 조직 내에서 SOD 효소 반응으로 생긴 H_2O_2 를 제거하는 효소이며, 당뇨 유발 시 CAT 활성은 효소의 당화반응에 의한 불활성화로 감소한다는 연구 결과가 보고되었다(22). 신장의 CAT 활성은 STZ군이 Con군에 비해 25.8% 감소하였다. AC군은 STZ에 비해 효소 활성이 10.3% 증가하였고 CL과 CH군은 활성이 각각 7.7, 24.6%, PhA군은 4.1% 증가하였다(Fig. 5B). 조직 내에서 SOD와 CAT의 활성이 Con군에 비해 STZ군에서 낮게 나타난 결과는 당뇨가 유도된 쥐에서 항산화 효소계의 활성 감소를 보고한 선행 결과와 일치하며(23), CFE와 PhA는 지질과산화물의 증

가로 산화적 손상이 가속화 될 때, 항산화 효소계의 활성을 증가시키고 산화 스트레스에 의한 조직 손상을 완화시켜주는 것으로 판단된다.

병리학적 소견

CFE와 PhA가 STZ로 유발한 당뇨쥐의 신장에 미치는 조직학적 변화를 알아보기 위하여 PAS 염색을 시행하였다. 본 연구에서 STZ로 당뇨를 유발한 쥐들의 혈당은 400-500 mg/dL였으며, 이러한 고혈당 상태에서 신장의 사구체로부터 배출된 포도당은 세뇨관에서 재흡수 되어 글리코젠을 포함한 신세뇨관 세포를(renal tubular cell) 형성하게 한다. 광학 현미경(CX-40, Olympus, Tokyo, Japan)으로 200배를 관찰에서 Con군은 사구체의 크기가 정상으로 확인되었고, 기저막의 비후나 세포의 기질의 축적 등 이상 징후가 관찰되지 않았다(Fig. 6). 그러나 STZ군은 원위세뇨관에서 글리코젠을 다량 포함한 신세뇨관 세포의 형성을 관찰하였다(화살표). 반면 CL, CH, PhA군에서는 STZ군에 비해 글리코젠 축적이 현저히 줄었으며, 침범된 세뇨관의 범위도 줄어드는 것을 확인하였다. 특히 PhA는 양성대조군인 AC와 비슷한 활성을 보이며 당뇨에 의한 고혈당으로부터 신장 보호효과가 있는 것을 확인하였다. 본 연구 결과는 정상 상태에서는 글리코젠이 포도당의 형태로 전환되어 사용되나, 당뇨가 유발됐을 경우 당 대사의 이상으로 과다한 글리코젠 및 지방이 축적되어 신장의 비대를 유발한다는 연구 보고와 일치하였다(24).

요 약

당뇨 모델 쥐에서 매생이 추출물과 그 지표물질인 pheophorbide A의 신장 보호 효과를 확인하였다.

5주령의 SD 랫드를 일주일간 순화시킨 뒤 40 mg/kg BW의 농도로 streptozotocin을 복강 투여하였으며, 한달 동안의 유도기간을 거쳐 모든 당뇨 유발군에서 혈당이 400-500 mg/dL가 된 것을 확인한 이후 9주 동안의 샘플 투여를 진행하였다. 신장 손상과 관련한 혈액 생화학적 지표인 BUN, creatinine에서는 당뇨 유발군 사이에 개선되는 경향을 보이지 않았다.

신장 조직에서 산화스트레스에 의해 유발되는 지질 과산화물을 측정 하였을 때 당뇨 유발군인 STZ군(0.19 ± 0.04)은 정상 대조

군인 Con군(0.05±0.00)에 비하여 3.5배 많은 MDA를 생성하였지만 매생이 추출물 4, 20 mg/kg BW투여한 CL, CH군은 MDA의 생성량이 0.05±0.02, 0.08±0.02, 지표물질인 pheophorbide A를 0.2 mg/kg BW을 투여한 PhA군은 0.12±0.01 nmol/mg protein으로 샘플 투여군에서 과산화물이 유의적으로 감소하는 것으로 보아($p<0.05$) CFE와 PhA의 항산화 작용을 확인할 수 있었다. 항산화 바이오마커인 GSH와 GSSH 함량 및 GPx, GR, GST 활성을 측정된 결과 CFE와 PhA는 산화스트레스에 의한 신장 조직의 GSH 함량이 감소하는 것을 막아 당뇨로 인한 신장 손상에 보호 효과가 있는 것을 확인하였다($p<0.05$). 또한 STZ에 유도된 당뇨 쥐의 신장 조직엔 많은 양의 과산화물이 축적되어 있으며 이를 소거하기 위해 GPx의 활성이 높아졌는데, AC군과 PhA군에서 GPx의 증가 정도를 유의적으로 완화시켰다($p<0.05$). GR 활성은 CL, CH, PhA군에서 Con군 수준까지 올라오는 것으로 보아 신장의 산화적 손상을 정상수준까지 회복 시키는 것으로 보였으며, GST 결과로 미루어 보아 CFE와 PhA는 신장 조직에서 일차적으로 과산화물을 포집하고 GSH를 이용하여 체내의 독성 물질을 분해시켜 STZ로 유도된 당뇨로부터 신장 보호 효과를 나타내었다. 또한, 조직 내에서 SOD와 CAT의 활성 측정 결과, CFE와 PhA는 지질과산화물의 증가로 산화적 손상이 가속화 될 때, 항산화 효소계의 활성을 증가시키고 산화 스트레스에 의한 조직 손상을 완화 시켜 주는 것으로 확인되었다. 신장 조직의 병리학적 관찰 결과 CL, CH 및 PhA군에선 STZ군에 비해 비이상적인 글리코겐의 축적이 유의적으로 저해 되는 것을 관찰할 수 있었다($p<0.05$). 위와 같은 실험 결과를 통하여 매생이 추출물과 PhA가 당뇨병성 신장 손상에 보호 효과가 있다는 것을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(한국산 해조류인 매생이(*Capsosiphon fulvescens*)를 이용한 미백 기능성과 항당뇨 및 항당뇨합병증 소재개발과 제품화).

References

- Choi YJ, Kim HC, Kim HM, Park SW, Kim J, Kim DJ. Prevalence and management of diabetes in Korean adults: Korea National Health and Nutrition Examination Surveys. *Diabetes Care* 32: 2016-2020 (2009)
- Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Ebeling P, Fuller JH. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in Type 1 diabetic patients. *J. Diabetes Complicat.* 20: 188-195 (2006)
- Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Inv. Drug.* 11: 1205-23 (2002)
- Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Invest.* 70: 138-151 (1994)
- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368 (1992)
- Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano N, Fukumoto H, Koh G, Kurose T, Yamada Y, Yano H, Seino Y, Imura H. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. *Metabolism* 37: 1040-1044 (1988)
- Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr. Diabetes Rep.* 14: 453 (2014)
- Ziyadeh FN. The extracellular-matrix in diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 22: 736-744 (1993)
- Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 56: 393-405 (1999)
- Ramachandran B, Kandaswamy M, Narayanan V, Subramanian S. Insulin mimetic effects of macrocyclic binuclear oxovanadium complexes on streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *Diabetes Obes. Metab.* 5: 455-461 (2003)
- Jung KJ, Jung CH, Pyeon JH, Choi YJ. Changes of food components in mesangi (*Capsosiphon fulvescens*), gashiparae (*Enteromorpha prolifera*), and cheonggak (*Codium fragile*) depending on harvest times. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 687-693 (2005)
- Hwang EK, Amano H, Park CS. Assessment of the nutritional value of *Capsosiphon fulvescens* (Chlorophyta): developing a new species of marine macroalgae for cultivation in Korea. *J. Appl. Phycol.* 20: 147-151 (2008)
- Lee JH, Lee YM, Lee JJ, Lee MY. Effects of *Capsosiphon fulvescens* extract on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 402-409 (2006)
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB. J.* 22: 659-661 (2008)
- Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol-Renal.* 290: F517-F529 (2006)
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.* 130: 461-470 (1999)
- Allen PJ. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci. Biobehav. R.* 36: 1442-1462 (2012)
- Bastar I, Seckin S, Uysal M, Aykac-Toker G. Effect of streptozotocin on glutathione and lipid peroxide levels in various tissues of rats. *Res. Commun. Mol Pathol Pharmacol.* 102: 265-272 (1998)
- Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes.* 36: 1014-1018 (1987)
- Putt DA, Zhong Q, Lash LH. Adaptive changes in renal mitochondrial redox status in diabetic nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharm.* 258: 188-198 (2012)
- Chow CK. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1066-1081 (1979)
- Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem. J.* 328: 599-605 (1997)
- Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 26: 387-392 (2000)
- Mauer SM, Steffes MW, Connett J, Najarian JS, Sutherland DE, Barbosa J. The development of lesions in the glomerular basement membrane and mesangium after transplantation of normal kidneys to diabetic patients. *Diabetes* 32: 948-952 (1983)