

리치 저분자 폴리페놀인 Oligonol의 Streptozotocin 투여 당뇨 쥐에서 산화적 스트레스와 관련된 간 손상에 미치는 영향

노 정 숙

동명대학교 식품영양학과

Effect of Oligonol, a Low Molecular Weight Polyphenol Derived from Lychee on Oxidative Stress-Related Hepatic Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Jeong Sook Noh

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University

ABSTRACT This study was conducted to examine whether or not oligonol, a low molecular weight polyphenol derived from lychee fruit, has an ameliorative effect on diabetes-induced oxidative stress-related hepatic damage in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Oligonol (10 or 20 mg/kg body weight; O10 or O20, respectively) was orally administered every day for 10 days to STZ-induced diabetic rats, and its effects were compared to vehicle-treated diabetic (Veh) and non-diabetic rats. Administration of 20 mg/kg of oligonol significantly decreased liver weight compared with the Veh group ($P<0.05$). Elevated levels of hepatic glucose, reactive oxygen species, peroxynitrite, and lipid peroxidation were detected in diabetic vehicle rats, whereas oligonol treatment significantly attenuated these levels ($P<0.05$). In diabetic vehicle rats, hepatic antioxidant enzyme protein levels decreased, whereas oligonol treatment showed significant elevated results. For inflammation-related protein expression, oligonol-treated groups showed insignificant reduction. Oligonol improved expression of proapoptotic protein caspase-3 in the liver of diabetic rats ($P<0.05$). In conclusion, these results provide important evidence that oligonol exhibits an inhibitory effect on oxidative stress and apoptosis-related protein expression as well as a hepato-protective effect against the development of diabetic complications in STZ-induced type 1 diabetic rats.

Key words: oligonol, diabetic rat, hepatic damage, oxidative stress, caspase-3

서 론

우리 사회의 서구화와 산업화에 따른 인구의 고령화 등으로 우리나라에서도 각종 만성질환의 발병이 증가하고 있다. 특히 우리나라의 30세 이상 당뇨병 유병률은 2001년 8.6%에 비해 2005년 9.1%, 2007년 9.6%, 2012년 11.0%로 같은 기간의 선진국에 비해 빠른 속도로 꾸준히 증가하고 있어서(1) 당뇨병은 국민 건강을 위협하는 심각한 요인으로 지적되고 있다(2). 당뇨병은 췌장의 베타세포의 인슐린 분비량이 부족하거나 결핍되어 발생하는 대사성 질환으로 열량원의 대사를 변형시키며, 이러한 대사 이상은 고혈압, 고지혈증, 비만 및 동맥경화성 혈관 장애를 일으킨다(3-5). 이러한 증상 외에도 망막증 신증, 신경장애, 감염증 등이 당뇨 합병증으로 나타날 수 있다. 당뇨병에서 만성화된 고혈당은 과도한 유리기(free radical)가 생성되거나 항산화 방어 기전의 활

성 감소로 산화적 스트레스가 증가되고 지질과산화에 의해 각 조직의 염증작용 증가 및 세포사멸 진행과도 관련이 있다(6,7). 따라서 고혈당으로 인한 활성산소종의 제거나 염증반응 또는 세포사멸 진행을 억제하는 것은 주요 장기에 나타날 수 있는 당뇨 합병증 예방의 중요한 예방기전이 될 수 있을 것이다.

비만과 당뇨를 포함한 대사적 장애와 관련된 합병증의 치료제로서 독성이나 부작용이 없는 천연 소재로부터 효과적인 물질을 찾으려는 노력이 계속되어 왔다(8). 현재 기능성 식품이나 식이 소재들은 부작용이 없고 자연에 풍부하며, 상업적 제품에 용이한 적용 가능성으로 인해 많은 주목을 받고 있다(9). 폴리페놀이 풍부한 식품들, 즉 포도주, 차류, 커피, 초콜릿 등은 건강에 유익한 항산화성 원료로 주목받고 있다. 특히 catechin류 성분들, 즉 resveratrol이나 curcumin 등은 항암, 항돌연변이, 항균 등의 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다(10-12).

리치(lychee, *Litchi chinensis*, Sapindaceae)는 예로부터 중국과 남아시아 지역에서 사용돼 왔다. 리치에는 폴리페놀이 다량 함유되어 있으며 가식 부위의 폴리페놀 함량은

Received 28 November 2014; Accepted 28 January 2015

Corresponding author: Jeong Sook Noh, Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 608-711, Korea
E-mail: jsnoh2013@tu.ac.kr, Phone: +82-51-629-1716

딸기 다음으로 높다(13). 리치 폴리페놀의 특징은 catechin 단일형태(monomer)와 소중합체(oligomer)인 proanthocyanidin을 함유하고 있다는 점이다. Proanthocyanidin은 구조적으로 catechin의 중합체(polymer)이며 높은 분자량을 가진다. 그러나 중합체는 경구적으로 섭취하였을 때 소화 흡수율이 낮으며 인체 내 활성 또한 높지 않다. 게다가 분자량이 높은 proanthocyanidin은 물에 잘 녹지 않으며 특징적인 쓴맛(수렴적인 맛), 즉 구강 단백질과 구강 점막 수용체와 결합하면서 느껴지는 감각으로 인해 식품산업에서의 이용도가 낮아진다(14). Tanaka 등(15)에 의해 고분자 proanthocyanidin을 저분자화 하는 기술이 성공적으로 개발되었고 그것이 식품산업에 이용되고 있다. 리치로부터 제조된 oligonol은 15.3% monomer(catechin 포함)와 16.7% 이합체(dimer, catechin과 procyanidin 포함)의 폴리페놀 복합체로 구성되어 있는데 반해 리치 폴리페놀은 6.4% monomer와 9.8% 이합체를 함유하고 있어 저분자량 폴리페놀 함유량이 낮다.

Oligonol의 다양한 생리적 효능이 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰되었다. 항암(16), 항산화 및 항염증(17), nitric oxide 생리이용성 증가 효과(18)와 지질대사 조절 작용(19,20) 등이 보고되었다. 게다가 2형 당뇨병모델인 *db/db* 마우스의 신장조직에서 항염증 및 최종 당화생성물 억제 효과, 간조직에서 지질대사 조절을 통한 지질 합성 억제 효과 등이 보고되어 oligonol은 당뇨병으로 인한 신장 및 간조직의 기능 장애에 대한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다(21-23). 그러나 oligonol을 1형 당뇨병 동물모델에서 단기간 투여 시 간조직 손상에 미치는 직접적 영향에 대한 결과가 미흡하다. 따라서 본 실험에서는 oligonol을 streptozotocin으로 1형 당뇨병을 유발한 쥐에 단기간 투여하여 간조직에서 증가된 산화적 스트레스 억제, 염증인자 및 세포사멸과 관련된 효소 발현에 미치는 영향에 대해 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 oligonol의 추출 및 제조, 분석 등은 Tanaka 등(15)에 의해 수행되었다. 즉 건조 리치를 50% (v/v) 에탄올로 추출·농축하고 흡착제를 충전한 칼럼을 통과시켜 여과하였다. 여과하여 얻어진 리치 에탄올 추출물을 녹차 추출액, citric acid와 혼합하여 60°C에서 16시간 가열하고 다시 여과한 다음, 40%(v/v) 에탄올로 추출 및 농축한 oligonol을 Amino Up Chemical(Sapporo, Japan)로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

실험동물 및 시료 투여

실험동물은 체중 100 g 내외의 Sprague-Dawley 수컷 rats로 효창사이언스(Daegu, Korea)에서 구입하였다. 실험 동물실의 환경은 온도 23±3°C, 습도 50±20%, 명암주기는

12시간으로 유지하였다. 사료는 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 7일간 실험실 환경에 적응을 위하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

Streptozotocin(STZ, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 50 mM citrate 완충용액(pH 4.5)에 녹여 STZ 50 mg/kg을 복강 주사하여 당뇨병을 유발하였다. 당뇨병 확인은 STZ 투여 48시간 후, 12시간 절식시키고 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 복강 주사 14일 후, 공복 혈당 수준이 350 mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하고 당뇨병대조군(Veh, n=8), oligonol 10 mg/kg 투여군(O10, n=5), oligonol 20 mg/kg 투여군(O20, n=5)으로 나누어 10일 동안 실험에 사용하였다. STZ 대신 buffer만 투여한 정상군(N, n=8)을 당뇨병군과 비교하였다. Oligonol 투여는 체중 kg당 10 mg과 20 mg을 증류수에 녹여 존대를 통해 매일 경구투여 하였고, 정상군과 당뇨병대조군은 실험기간 동안 동량의 증류수를 투여하였다. 실험군의 체중은 실험 시작 전과 종료일에 측정하였으며 실험동물 과정은 대구한의대학교의 지침에 따라 수행하였다(DHU2014-009).

혈액 및 장기 적출, 샘플사이즈

실험 종료 후 12시간 동안 절식시킨 실험동물을 에테르로 마취시킨 후 개복하여 심장에서 혈액을 채취하였고, 곧바로 생리식염수로 관류하였다. 채취한 혈액은 실온에서 20분간 방치한 후 원심분리기에서 3,000 rpm, 15분 동안 회전시켜 상층부인 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -70°C에서 냉동 보관한 후 분석에 사용하였다. 간조직은 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거하여 중량을 측정한 다음 일정 부위를 채취하여 각 실험항목별로 분리하였다. 이를 액체질소로 급속 동결한 다음 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험항목별 혈청 및 간조직 샘플 수는 모든 실험군의 동물 개체수로 각각 정상군 8개, 당뇨병대조군 8개, O10군 5개, O20군 5개이다.

혈청 및 간조직 glucose 농도 측정

혈청 glucose 농도는 glucose oxidase법으로 제조된 포도당 측정용 시약(Glucose-E kit, Youngdong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)을 사용하여 505 nm에서 비색 정량 하였다. 간조직의 glucose 농도를 측정하기 위해 먼저 간조직을 0.9% NaCl, 0.15 M Ba(OH)₂, 5% ZnSO₄를 넣어 균질화한 다음 원심분리(1,400×g, 15 min, 4°C) 하여 상층액을 분리하고, 포도당 측정용 시약을 사용하여 비색정량 하였다(24).

간조직 ROS, peroxynitrite, MDA 함량 측정

ROS(reactive oxygen species) 생성 정도는 Ali 등(25)의 방법을 사용하였다. 먼저 간조직을 차가운 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 마쇄하여 균질화한 다음 원심분리 하여 상등액을 분리하고 25 mM

2',7'-dichlorofluorescein diacetate를 가하여 30분간 암소에서 방치한 다음 excitation 468 nm, emission 530 nm 파장에서 형광도를 측정하였다. Peroxynitrite 소거 활성은 Kooy 등(26)의 방법에 따라 dihydrorhodamine(DHR) 123이 산화되는 정도로 측정하였다. DHR 123(5 mM)은 dimethylformamide로 녹여서 질소로 purge 한 후에 -80°C 에 보관하였으며, 사용하기 직전에 암실의 얼음 위에서 조제하여 사용하였다. 실험에 이용되는 반응액(200 μL)은 90 mM sodium chloride와 5 mM potassium chloride를 포함하는 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 diethylentriaminepenta acetic acid를 100 μM 로 혼합하고 DHR 123 용액을 5 μM 이 되게 혼합한 후 실험 농도로 희석한 시료 10 μL 와 200 μM peroxynitrite 10 μL 를 첨가하여 사용하였다. Peroxynitrite anion 소거 활성은 상기의 반응액을 실온에서 5분간 반응시킨 후 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm로 하여 실온에서 측정하였다.

간조직의 MDA(malondialdehyde) 농도는 MDA ELISA kit(E0597Ra, USCNLife, Wuhan, Hubei, China)을 이용하여 450 nm에서 multireader기를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준용액의 흡광도를 통해서 회귀식을 산출하여 간조직의 MDA 농도를 계산하였다(27).

간조직 nuclear 및 post-nuclear fraction 분리

간조직의 western blotting을 하기 위해 rat 한 마리당 일정 부위의 간조직 일부를 해부 직후 채취하여 액체 질소로 급속냉동 하여 냉동고에 보관 후 시료로 사용하였다. Nuclear fraction을 분리하기 위해 먼저 간조직을 차가운 lysis buffer[5 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol(Tris)-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 1.5 M sucrose, 0.1 M dithiothreitol(DTT), protease inhibitor cocktail]에 넣어 homogenate 하였다. 원심분리(10,500 \times g, 20분, 4°C) 후 상등액은 post-nuclear fraction으로, pellet은 nuclear fraction을 분리하기 위해 사용하였다. Pellet에 핵추출 buffer[20 mM 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazyl) ethanesulfonic acid(pH 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 25%(v/v) glycerol, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail]를 첨가하여 ice에서 30분간 방치한 후 소거 활성(20,500 \times g, 5 min, 4°C) 하여 상등액을 nuclear fraction으로 사용하였다. Nuclear fraction은 핵전사인자인 nuclear factor kappaB(NF- κ B) 단백질 발현 정도를, post-nuclear fraction은 superoxide dismutase(SOD)-1, catalase, inducible nitric oxide synthase(iNOS), caspase-3을 측정하기 위해 사용하였다. 각 fraction의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하고 Lowry 등(28)의 방법을 이용하여 정량하였다.

간조직 western blotting

단백질이 정량된 샘플에 Laemmli sample buffer를 혼합

하여 western blotting용 샘플을 조제하였다. Target 단백질 분석을 위하여 10% SDS-PAGE에 단백질 샘플을 각각 20 mL 분주한 후에 100 V에서 전기영동 하여 단백질을 분리하였다. 단백질 분리 후 100 V에서 1시간 동안 polyvinylidene difluoride membrane으로 전이시켰다. 전이가 끝난 후 5% BAS가 포함된 blocking buffer(TBST buffer; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05%, Tween-20)를 이용하여 blocking을 실시하였다. 1차 항체인 SOD-1, catalase, NF- κ B, iNOS, caspase-3, β -actin, histone(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 5% skim milk에 희석한 후 membrane에 분주하고 4°C 에서 over-night 시킨 후 TBST buffer를 이용하여 10분간 5회 씻어내었다. 그리고 2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 각각 1:2,000으로 희석하여 한 시간 동안 반응을 시킨 후 TBST buffer로 10분간 5회 씻어냈으며, 이에 따라 도출된 밴드의 동정은 enhanced chemiluminescence kit을 이용해 membrane을 발광시킨 후 X-ray film에 현상하였다. Band의 density는 densitometry(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 정량하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 모든 데이터는 평균과 표준오차로 나타내었고, 각 평균치 간 차이에 대한 유의성은 SPSS(Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 ANOVA를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 5% 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

STZ 당뇨 유발 rat의 체중, 사료섭취량, 음수량 및 간 무게 변화

STZ-당뇨 유발 rat의 체중 변화(Table 1)는 실험기간 10일 동안 당뇨대조군이 24.5 ± 3.0 g 감소하였고, 정상군은 18.0 ± 2.1 g 증가하였다($P < 0.05$). 이는 1형 당뇨의 전형적인 증상으로 당뇨가 진행됨에 따라 사료섭취 및 음수량이 증가하는 데 비해 체중 감소가 심해진다. Oligonol 투여군은 당뇨대조군과 비교하여 유의적으로 체중 감소 정도가 낮아졌다. 사료섭취량과 음수량 모두 정상군에 비해 당뇨군에서 모두 유의적으로 높아졌으나 oligonol 투여에 따른 유의적 변화는 나타나지 않았다. 단위 무게당 간 중량은 정상군에 비해 당뇨대조군에서 166.7% 유의적으로 증가되어 1형 당뇨 상태에서 간의 무게가 증가함을 알 수 있었다. 당뇨 상태에서의 간 무게 증가 현상은 인슐린 저항성 및 결핍으로 인한 세포의 glucose 이용률 감소와 체지방의 분해에 따른 유리지방산 증가 및 간에서의 중성지방 합성이 증가하기 때문인 것으로 보고되고 있다(29). 그러나 oligonol 20 mg/kg 투여군에서 당뇨대조군에 비해 간 무게가 23% 정도 유의적

Table 1. Body weight, food intake, water intake, and liver weight

| Group ¹⁾ | Body weight gain (g/10 d) | Food intake (g/d) | Water intake (mL/d) | Liver weight (g) | Liver weight (g/100 mg B.W) |
|---------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| N | 18.0±2.1 ^{a2)3)} | 23.3±0.3 ^b | 27.6±0.8 ^b | 13.0±0.7 ^a | 3.1±0.1 ^c |
| Diabetic rat | — | — | — | — | — |
| Veh | -24.5±3.0 ^c | 38.4±0.7 ^a | 215.8±3.1 ^a | 12.6±0.6 ^a | 5.2±0.3 ^a |
| O10 | -16.3±1.7 ^b | 37.0±0.6 ^a | 208.7±4.3 ^a | 12.5±0.6 ^a | 5.3±0.5 ^a |
| O20 | -15.0±6.6 ^b | 39.7±0.5 ^a | 220.6±3.6 ^a | 9.5±0.3 ^b | 4.0±0.2 ^b |

¹⁾N: non-diabetic rat (n=8), Veh: vehicle-treated diabetic rat (n=8), O10: oligonol 10 mg/kg body weight-treated diabetic rat (n=5), O20: oligonol 20 mg/kg body weight-treated diabetic rat (n=8).

²⁾Results are expressed as means±SE.

³⁾Means with different letters (a-c) within a column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

으로 감소하였다. 이는 당뇨대조군에 비해 체중 감소가 적었음에도 간 무게 증가가 낮아진 것은 당뇨 쥐의 간조직에서 oligonol의 지질합성 저해 효과 때문인 것으로 사료된다(22).

Oligonol의 혈청 및 간조직 glucose 농도에 미치는 영향

Table 2에서 보는 바와 같이 STZ를 투여한 당뇨그룹이 STZ를 투여하지 않은 정상군보다 혈당치가 매우 높았다($P<0.05$). 당뇨군에 oligonol을 투여한 결과 유의적인 변화는 없었으며, 선행연구와 동일하게 본 연구에서도 oligonol 투여는 혈당 조절에는 직접적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(21). 그러나 간조직의 glucose 농도를 측정할 결과 정상군에 비해 당뇨대조군에서 유의적으로 크게 증가한 간조직 내 glucose 농도는 20 mg/kg oligonol 투여 시 32.0% 감소하였다($P<0.05$). 당뇨병 상태에서는 간에서 glu-

cose uptake와 incorporation이 증가하여 간조직 내 glucose가 축적되는 것으로 알려져 있으며(30), 본 실험에서의 결과와 일치하였다. 그리고 oligonol은 이러한 간조직 내 glucose 농도를 낮추었으며, 이는 간조직 내 지나친 glucose 유입 및 축적에 기인하는 활성산소 생성 및 당화 최종 생성물 합성의 촉진 반응을 억제하는 작용으로 사료된다.

Oligonol의 ROS, peroxynitrite, 지질과산화 생성에 미치는 영향

간조직 중의 ROS 및 peroxynitrite, 지질과산화 함량은 Fig. 1에서와 같이 당뇨대조군인 Veh군에서 정상군에 비해 각각 120.0%, 160.5%, 141.4% 증가되었다. 그러나 oligonol 10 또는 20 mg/kg 투여군에서 ROS 및 지질과산화 생성 수준은 Veh군에 비해 현저하게 감소되어 정상군 수준과 유사하였다($P<0.05$). 또한 peroxynitrite 생성 또한 oligonol 20 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 당뇨병 상태에서 산화적 스트레스 증가는 비효소적 당화(nonenzymatic glycosylation)와 자동산화적 당화(autooxidative glycosylation)의 증가, 항산화방어계(antioxidative defense system)의 변화 등으로 인하여 일어난다고 알려져 있다(31,32). 이러한 산화 스트레스로 인하여 생체 대사 과정 중에 free radical이나 지질과산화물이 끊임없이 생성되는데 생체에는 이들의 축적을 방지하기 위해 작동되는 SOD, catalase와 같은 산화적 방어 체계가 있어서 이들을 제거하지만 질병상태에서와 같이 과도한 산화적 스트레스 상태에서는 방어 체계가 깨뜨려지므로 free radical

Table 2. Changes of serum and liver glucose level

| Group ¹⁾ | Serum glucose (mg/dL) | Hepatic glucose (mg/mg protein) |
|---------------------|-------------------------|---------------------------------|
| N | 128.7±0.5 ^b | 103.6±6.2 ^c |
| Diabetic rat | — | — |
| Veh | 413.4±1.1 ^a | 255.5±23.5 ^a |
| O10 | 415.1±16.5 ^a | 219.2±16.0 ^a |
| O20 | 389.6±12.8 ^a | 173.8±14.9 ^b |

¹⁾Groups are the same as Table 1.

²⁾Results are expressed as means±SE.

³⁾Means with different letters (a-c) within a column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

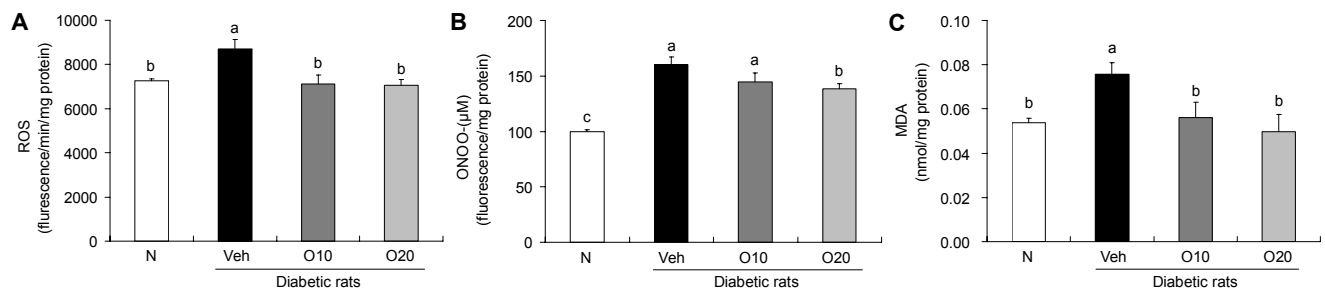


Fig. 1. ROS, ONOO⁻, and MDA production in the liver. Groups are the same as Table 1. Results are expressed as means±SE. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

생성이 증가된다. 생성된 superoxide radical(O_2^-), peroxynitrite($ONOO^-$), hydroxyl radical($\cdot OH$) 등은 세포에 상해를 주며, 특히 세포막의 다불포화지방산에 작용하여 지질과산화물을 생성하고 이로 인해 세포의 기능을 손상시키는 것은 이미 알려져 있다(33).

활성산소 외에 산화적 스트레스를 증가시키는 또 다른 활성물질인 산화질소 역시 염증 반응의 매개자로 작용하는데 염증반응이 활성화되면 여러 종류의 세포에서 iNOS의 발현이 촉진되고 그로 인하여 산화질소의 생성량이 증가된다. NO는 nitric oxide synthase에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 물질로 체내방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등 다양한 생리기능을 나타낸다. 그러나 nitric oxide의 생성량이 정상 이상으로 지속적으로 상승하게 되면 염증성 질환이 발생할 수 있으며 산소와 결합하여 생성된 $ONOO^-$ 는 세포와 조직에 산화적 손상을 주고 유전자 변이, 폐혈성 쇼크 및 신경손상 등을 일으키고 생성된 $ONOO^-$ 의 제거 능력이 현저히 떨어지기 때문에 활성산소의 생성을 억제하든지 병리적 nitric oxide 생성 효소 발현을 낮추는 것이 매우 중요하다(34,35).

1형 당뇨에 있어 간조직의 과산화물 생성 정도를 알아보기 위해 MDA 농도를 측정하였다. Fig. 1에서 정상군에 비해 당뇨대조군에서 MDA 농도가 유의적으로 높았으며, 이렇게 증가된 MDA의 농도는 oligonol을 투여한 O10군과 O20군 모두에서 유의하게 낮아졌다($P < 0.05$). 생체 내 지질과산화물은 DNA를 손상하며 발암, 돌연변이, 유전자의 손실 및 노화의 기전으로 알려져 있다. 이는 당뇨 발생 시 산화적 스트레스의 증가로 인하여 조직 내의 과산화물이 증가하였고 이는 간조직에서 MDA 함량이 증가했다는 다른 보고(36,37)와 같으며, STZ로 당뇨를 유도한 쥐에서 간의 지질과산화 함량의 증가는 조직의 손상을 더욱 가속화할 것으로 사료된다. 그러나 oligonol을 투여한 결과 O10과 O20군 모두에서 지질과산화물 함량이 낮아졌으며 이는 ROS 및 $ONOO^-$ 와 같은 free radical 제거능과 함께 간조직의 산화적 스트레스를 완화시키는 요인으로 작용한 것으로 생각된다.

Oligonol의 간조직 SOD 및 catalase 단백질 발현에 미치는 영향

SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2 로 전환시키며 이때 생성된 H_2O_2 등은 GSH-peroxidase, catalase 등의 작용에 의해 H_2O 로 무독화됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호하게 되는 것이다(38). Microsome의 cytochrome P450 및 mitochondria의 respiratory generating system에 의해 생성되는 ROS는 여러 종류의 질병 유발에 관여한다(39). 고혈당성 당뇨 상태에서는 ROS 생성계가 활성화되는 반면 ROS 소거 활성은 감소한다(40). 본 실험 결과 STZ로 유발한 당뇨 쥐에서 간조직의 SOD 및 catalase 발현 정도는 정상군에 비해 당뇨 유발군에서 현저히 감소하였으나 oligonol 투여군에서는 SOD 및 catalase 단백질 발현이 유의적으로 증가하였다(Fig. 2). 이것은 oligonol의 활성산소 생성 억제 및 지질과산화 억제 효과는 직접적인 라디칼 소거 효과에 기인하는 것으로 사료된다. Oligonol에는 catechin 기본구성 monomer와 oligomer가 다량 함유되어 있고 이러한 물질들의 활성산소종 소거능은 매우 효과적인 것으로 보고되고 있다(41).

Oligonol의 간조직 NF- κ B 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

Fig. 3에서 보는 바와 같이 STZ-유발 당뇨 쥐의 간조직에서 염증조절 전사인자인 NF- κ B와 그 타겟 단백질인 iNOS의 발현 정도를 측정하였다. 정상군에 비해 당뇨대조군의 NF- κ B 및 iNOS 단백질 발현이 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 그러나 oligonol 투여군에서는 높아진 염증성 인자의 발현이 낮아지는 경향은 보였으나 유의적이지 않았다. 활성산소는 NF- κ B를 활성화시켜 염증 촉진 cytokine과 chemokine, 성장인자들의 발현을 촉진하고 저밀도지단백의 과산화(oxidized-LDL)를 증가시켜 여러 조직에서 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-6 등의 염증촉진 물질들을 증가하게 한다(42). 염증반응은 광범위한 외부 자극에 대하여 신체를 보호하기 위한 가장 중요한 면역작용

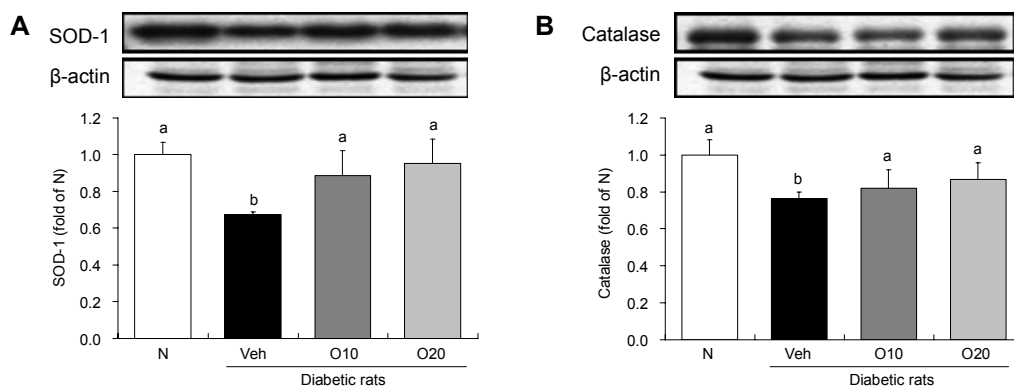


Fig. 2. Hepatic SOD-1 and catalase expressions. Groups are the same as Table 1. Results are expressed as means \pm SE. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

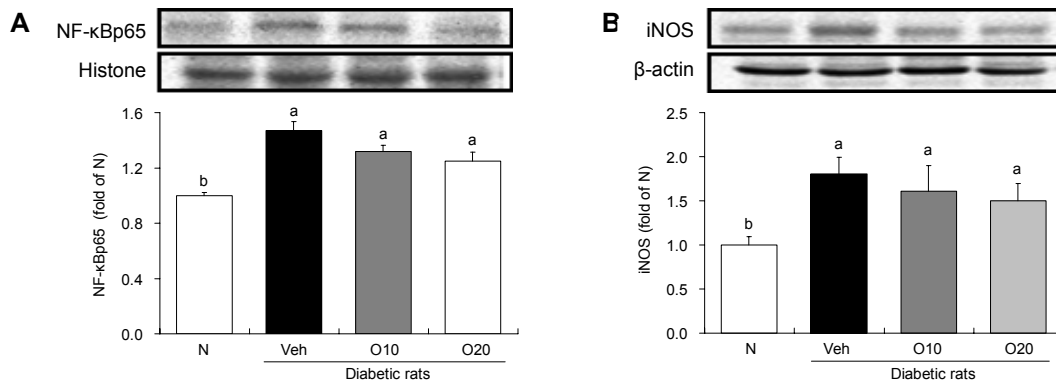


Fig. 3. Hepatic NF-κBp65 and iNOS expressions. Groups are the same as Table 1. Results are expressed as means±SE. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

중의 하나이지만 그 정도가 과도하거나 장기화되면 여러 가지 질환을 유발하게 되는데 염증상태에서는 대식세포가 활성화되어 과도한 산화질소와 prostaglandin(PG) E₂, TNF-α, 염증촉진성 사이토카인, 부착성 물질 등의 분비를 증가시키는 것이 특징이다(43). 증가된 TNF-α는 당뇨병성 지방간 초기단계에서 간의 직접적인 손상을 유도하며, IL-1β는 간조직의 섬유화에 관여하는 fibronectin의 발현을 증가시킨다. 선행연구에서 제2형 당뇨 동물모델에 8주간 oligonol을 투여한 후 염증인자 발현을 억제한 결과를 살펴보았을 때 본 연구에서 oligonol 투여군의 결과는 실험기간이 단기간인 것을 감안하면 당뇨 쥐의 간조직에서 유전자적 조절기전이 진행 중인 것으로 사료된다.

Oligonol의 간조직 caspase-3 단백질 발현에 미치는 영향

세포사멸과 밀접한 관련이 있는 간조직 caspase-3 단백질 발현 정도를 측정하였다(Fig. 4). 간조직 caspase-3 발현은 정상군에 비해 STZ 투여 당뇨대조군에서 크게 증가하였다($P<0.05$). 그러나 당뇨대조군에 비해 oligonol 투여군에서 증가된 caspase-3 발현이 유의적으로 억제되었다

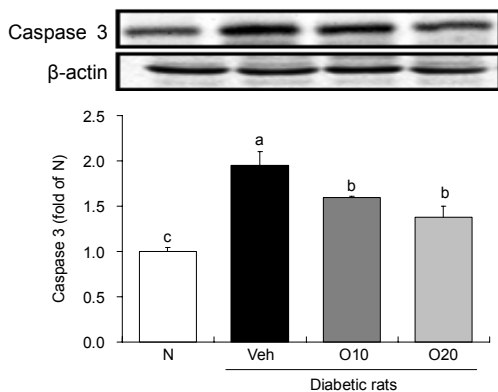


Fig. 4. Hepatic caspase-3 expressions. Groups are the same as Table 1. Results are expressed as means±SE. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

($P<0.05$). 이러한 결과는 STZ 투여로 인해 간조직의 세포사멸과 관련된 caspase-3 활성이 증가되어 간 손상이 유발되었으며, oligonol 투여는 효과적으로 효소 발현 정도를 낮추어 세포사멸과 관련된 간조직 손상을 억제할 것으로 사료된다. 특히 oligonol에 다량 함유되어 있는 proanthocyanidin과 polyphenol은 지질산화 억제와 활성산소 생성 억제를 통해 산화적 스트레스와 관련한 세포사멸을 효과적으로 억제한다고 보고되었다(44).

고혈당에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 각 조직에 많은 세포적 반응을 일으킨다. 세포 수준에서 고농도 글루코스에 의한 세포사멸은 지속적인 산화적 스트레스에 기인한다. 과도한 활성산소의 생성뿐만 아니라 불충분한 항산화력은 세포구성 성분에 damage를 준다. 고혈당으로 유도된 free radical의 공격은 지질, 단백질과 DNA 손상에 의한 세포사멸을 증가시킨다. 적어도 프로그램된 세포사멸(apoptosis)은 고농도의 포도당에 의한 독성과 관련 있는 것으로

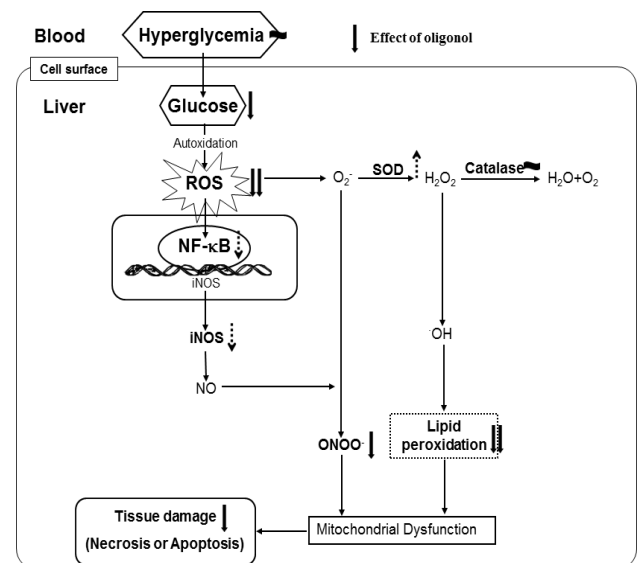


Fig. 5. Predicted mechanism in hepatic tissue on administering oligonol against oxidative stress in STZ-induced diabetic rats.

여겨진다(45,46). Apoptosis는 다양한 전사인자와 유전자에 의해 유도된다. Bax 발현이 증가하고 Bcl-2 발현이 조절되며, 미토콘드리아에서 cytochrome c의 방출이 증가하면 그에 따라 caspase-3, -9, -8이 차례로 활성화되어 세포사멸이 진행된다(47). 또한 세포사멸이 진행됨에 따라 염증성 인자인 NF- κ B와 iNOS 발현이 STZ-유도 당뇨 시험 동물모델에서 증가하는 것으로 보고되었다(48).

리치의 폴리페놀을 저분자화한 oligonol이 1형 당뇨 유발 rat에서의 효과를 Fig. 5에 도식화하였다. Oligonol 투여는 고혈당과 지질대사 이상으로 인한 간의 비대화를 억제하였으며 간조직의 산화적 스트레스를 유발하는 ROS 및 ONOO⁻, 지질과산화물 생성을 효과적으로 억제하였다. 이러한 free radical 생성 억제는 간조직의 항산화 효소 발현을 유의적으로 증가시켰다. 그러나 염증 유발 인자인 NF- κ B 및 iNOS의 발현 억제로 나타날 것으로 예상하였지만 oligonol의 단기간 투여로 간조직 보호 효과에 대한 경향은 보였으나 유의적이지 않았다. 특히 세포사멸과 관련 있는 효소인 caspase-3의 단백질 발현은 산화적 스트레스로 인해 증가된 활성이 oligonol 투여군에서 유의적인 감소 효과가 나타났다.

요 약

본 연구에서는 STZ 유발 당뇨 쥐에서 고혈당 및 산화적 스트레스 관련 간 손상 기전에 oligonol의 영향에 대해 살펴보고자 하였다. 10일 동안 oligonol을 투여한 결과 20 mg/kg oligonol 투여군에서 당뇨대조군에 비해 간 무게 및 간조직의 glucose, ROS, peroxynitrite, 지질과산화물 농도가 유의적으로 감소하였다. 간조직의 항산화 효소 단백질 발현을 측정된 결과 정상군에 비해 당뇨대조군에서 발현 정도가 낮아졌지만 oligonol 투여군에서는 유의적으로 증가하였다. 또한 caspase-3 효소의 단백질 발현은 당뇨대조군에서 증가하였으나 oligonol 투여군에서 그 발현이 억제되었다. 따라서 oligonol의 투여는 STZ-유발 당뇨 모델에서 ROS 및 지질과산화물 생성 억제와 항산화효소 작용의 증가 및 세포사멸 작용이 있는 caspase-3 발현 억제를 통해 고혈당 및 산화적 스트레스에 의해 유발되는 간 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 동명대학교 교내학술연구비 지원(2013A037)에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ministry for Health, Welfare and Family Affairs. The Forth Korea National Health and Nutrition Examination Survey

- (KNHANES IV). http://www.mw.go.kr/front_new/al/sal0301vw.jsp?PAR_MENU_ID=04&MENU_ID=0403&CONT_SEQ=305115&page=1 (accessed Oct 2014).
2. Ahn KJ. 2010. Westernization of Korean diabetes. *Korean Clin Diabetes J* 11: 91-94.
3. Sakurai T, Tsuchiya S. 2006. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett* 236: 406-410.
4. Lyons TJ. 1991. Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? *Diabet Med* 8: 411-419.
5. Tai ES, Lim SC, Tan BY, Chew SK, Heng D, Tan CE. 2000. Screening for diabetes mellitus: a two-step approach in individuals with impaired fasting glucose improves detection of those at risk of complications. *Diabet Med* 17: 771-775.
6. Schattenberg JM, Schuchmann M. 2009. Diabetes and apoptosis: liver. *Apoptosis* 14: 1459-1471.
7. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, Matsubara H, Kim S, Kaneda Y, Ogiwara T. 2001. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes* 50: 1472-1481.
8. Winslow LC, Kroll DJ. 1998. Herbs as medicines. *Arch Intern Med* 158: 2192-2199.
9. Jones PJ, Varady KA. 2008. Are functional foods redefining nutritional requirements? *Appl Physiol Nutr Metab* 33: 118-123.
10. Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. 1993. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res* 21: 289-299.
11. Hsieh TC, Wu JM. 1999. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 249: 109-115.
12. Pal S, Choudhuri T, Chattopadhyay S, Bhattacharya A, Datta GK, Das T, Sa G. 2001. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 658-665.
13. Brat P, Georgé S, Bellamy A, Du Chaffaut L, Scalbert A, Mennen L, Arnault N, Amiot MJ. 2006. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr* 136: 2368-2373.
14. Haslam E. 1998. *Practical polyphenolics, from structure to molecular recognition and physiological action*. 16th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 192-194.
15. Tanaka T, Yoshitake N, Zhao P, Matsuo Y, Kouno I, Nonaka G. 2007. Production of oligomeric proanthocyanidins by fragmentation of polymers. *Jpn J Food Chem* 14: 134-139.
16. Jo EH, Lee SJ, Ahn NS, Park JS, Hwang JW, Kim SH, Aruoma OI, Lee YS, Kang KS. 2007. Induction of apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells by oligonol is mediated by Bcl-2 family regulation and MEK/ERK signaling. *Eur J Cancer Prev* 16: 342-347.
17. Kundu JK, Chang EJ, Fujii H, Sun B, Surh YJ. 2008. Oligonol inhibits UVB-induced COX-2 expression in HR-1 hairless mouse skin - AP-1 and C/EBP as potential upstream targets. *Photochem Photobiol* 84: 399-406.
18. Zhang XH, Yokoo H, Nishioka H, Fujii H, Matsuda N, Hayashi T, Hattori Y. 2010. Beneficial effect of the oligomerized polyphenol oligonol on high glucose-induced changes in eNOS phosphorylation and dephosphorylation in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 159: 928-938.
19. Ogasawara J, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Sakurai T, Kizaki T, Izawa T, Ishida H, Ohno H. 2009. Oligonol, a new lychee fruit-derived low-molecular form of polyphenol,

- enhances lipolysis in primary rat adipocytes through activation of the ERK1/2 pathway. *Phytother Res* 23: 1626-1633.
20. Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. 2003. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis* 24: 1379-1388.
 21. Noh JS, Kim HY, Park CH, Fujii H, Yokozawa T. 2010. Hypolipidaemic and antioxidative effects of oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, on renal damage in type 2 diabetic mice. *Br J Nutr* 104: 1120-1128.
 22. Noh JS, Park CH, Yokozawa T. 2011. Treatment with oligonol, a low-molecular polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced hepatic damage through regulation of oxidative stress and lipid metabolism. *Br J Nutr* 106: 1013-1022.
 23. Park CH, Yokozawa T, Noh JS. 2014. Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced renal damage through the advanced glycation end product-related pathway in db/db mice. *J Nutr* 144: 1150-1157.
 24. Momose T, Yano Y, Ohashi K. 1963. Organic analysis. XL IV. A new deproteinizing agent for determination of blood sugar. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 11: 968-972.
 25. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 12: 637-648.
 26. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 16: 149-156.
 27. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
 28. Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 29. Goldberg RB. 1981. Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 4: 561-572.
 30. Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, Boss O, Kahn BB. 2004. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest* 114: 1666-1675.
 31. Ceriello A. 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49: 27-29.
 32. Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, McMaster D, Catherwood MA, McGinty AM, Trimble ER. 1998. Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes* 147: 801-809.
 33. Ebadi M, Sharma SK. 2003. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 5: 319-335.
 34. Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Briviba K, Sies H. 1996. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 24: 4105-4110.
 35. Bordan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
 36. Ruiz C, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ. 1999. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 59: 99-105.
 37. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. 2000. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab* 26: 387-392.
 38. Hayes JD, Ellis EM, Neal GE, Harrison DJ, Manson MM. 1999. Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress. *Biochem Soc Symp* 64: 141-168.
 39. Nohl H, Jordan W. 1980. The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur J Biochem* 111: 203-210.
 40. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U. 2003. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 142: 172-177.
 41. Henning SM, Fajardo-Lira C, Lee HW, Youssefian AA, Go VL, Heber D. 2003. Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutr Cancer* 45: 226-235.
 42. Boden G. 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18: 139-143.
 43. Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD. 2002. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1921-1925.
 44. Boghdady NA. 2013. Antioxidant and antiapoptotic effects of proanthocyanidin and ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiac injury in rats. *Cell Biochem Funct* 31: 344-351.
 45. Montane J, Cadavez L, Novials A. 2014. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 25-34.
 46. Akash MS, Rehman K, Chen S. 2013. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 114: 525-531.
 47. Robertson JD, Orrenius S. 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30: 609-627.
 48. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 24: 1777-1789.