

고지방식이와 저용량 스트렙토조토신으로 유도된 2형 당뇨병 흰쥐에서 녹차 폴리페놀과 비타민 C 병합 투여 효과

이병래¹ · 양 훈¹ · 박평심²

¹조선대학교 의과대학 생화학분자생물학교실

²조선이공대학교 식품영양조리학과

Effects of Green Tea Polyphenol and Vitamin C on Type 2 Diabetic Rats Induced by Low Dose Streptozotocin Following High Fat Diet

Byoung-Rai Lee¹, Hoon Yang¹, and Pyoung-Sim Park²

¹Department of Molecular Biology & Biochemistry, College of Medicine Chosun University

²Department of Food Nutrient and Culinary, Chosun College of Science & Technology

ABSTRACT This study investigated the effects of green tea polyphenol and vitamin C on type 2 diabetes mellitus by administering polyphenon 60 (P60) and sodium ascorbate (SA) to diabetic rats induced by high fat diet/low-dose streptozotocin. The experimental group was divided into five different groups: non-diabetic control group (NC), diabetes control group (DC), diabetes+P60 group (DM+P60), diabetes+SA group (DM+SA), and diabetes+P60+SA group (DM+P60+SA). P60 and SA were dissolved in 0.1% drinking water. After P60 and SA were administered for 16 weeks, fasting blood glucose, plasma insulin, serum triglyceride, blood urea nitrogen (BUN), and creatinine levels as well as kidney alkaline phosphatase (AP) and γ -glutamyltranspeptidase (GGT) activities were measured. Fasting blood glucose level increased 5-fold in the DC group compared to the NC group. In the DM+P60 group, fasting blood glucose level decreased by 14%. In the DM+P60+SA group, fasting blood glucose level decreased by 28% compared to the DC group, whereas the DM+SA group did not show any significant difference. The homeostasis model assessment for insulin resistance index increased in the DC group and decreased in the DM+P60+SA group compared to the DC group. Serum creatinine level increased in the DC group, but decreased by 17% in the DM+P60 group and by 43% in the DM+P60+SA group compared to the DC group. The serum BUN level increased in the DC group, but decreased by 41% in the DM+P60+SA group compared to the DC group. Kidney GGT and AP activities decreased in the DC group compared to the NC group; however, they were reversed by DM+P60+SA group. These results show that combined administration of both green tea polyphenol and vitamin C had better effects on improving blood glucose level, insulin resistance, serum triglyceride level, and protecting kidneys than administration of either green tea polyphenol or vitamin C alone in the context of type 2 diabetes.

Key words: type 2 diabetes, green tea polyphenol, vitamin C

서 론

당뇨병은 만성 대사성 질환으로서 세계적으로 환자 수가 계속 증가하고 있는데, 국제 당뇨병 연맹(IDF)의 통계에 의하면 2013년 당뇨병 환자 수는 3.8억 명 정도로 추정되며, 2035년에는 5.9억 명 정도로 증가할 것으로 예상된다(1). 당뇨병 환자의 증가는 대부분 2형 당뇨병에 의한 것으로 2형 당뇨병은 인슐린 비의존형 당뇨병으로서 인슐린 저항성, 인슐린 분비 이상 및 인슐린 분비세포의 apoptosis 및 간

포도당 생성 증가 등의 원인에 의한 혈당 조절의 이상과 관련이 있는 것으로 알려졌다(2). 당뇨병 환자에게 혈당 조절을 위해 사용되는 경구용 혈당강하제는 sulphonylureas, biguanides, thiazolidinediones(TZDs) 및 α -glucosidase inhibitor 등이 있고, 최근에 개발된 제재로는 glucagon-like peptide-1 agonists, dipeptidyl peptidase-IV inhibitors 및 amylin analogues 등이 있다(3). 경구용 혈당강하제는 장기간 사용하면 약효가 감소하거나 약물 부작용이 나타날 수 있으며, 혈당 조절 기능을 회복하여 당뇨병을 근본적으로 치료할 수 있는 방법이 아직까지 개발되어 있지 않기 때문에 당뇨병 치료를 위한 새로운 제제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 식물에서 추출한 천연물은 화학 합성 의약품에 비하여 부작용이 적기 때문에 질병의 치료나 건강증진을 위한 목적으로 많은 연구가 진행되고 있다(4). 식물에 풍부

하게 들어 있는 폴리페놀(polyphenol)은 항산화 작용, 항균 작용 및 항암 작용 등 생리활성이 알려지면서 천연물을 연구하는 연구자들의 관심을 끌고 있다(4,5). 폴리페놀은 구조에 따라서 phenolic acids, flavonoids, stilbenes 및 lignans 등으로 나눌 수 있고, flavonoids에는 flavonols, flavones, flavanols, flavanones, isoflavones 및 anthocyanidins 등이 포함된다(5). Flavonoid는 과일, 채소, 차, 콩 및 식물재료뿐만 아니라 이들을 이용한 가공식품이나 음료 등에도 포함되어 있으며, 당뇨병, 암, 심혈관질환 및 골다공증 등의 질환 발생과 flavonoid 함유 식품의 섭취량은 연관성이 있다고 한다(6,7). Hanhineva 등(8)은 폴리페놀이 탄수화물의 소화, 흡수 및 대사에 영향을 미친다고 하였고, Wedick 등(9)은 flavonoid 식이가 2형 당뇨병의 발생과 연관이 있다고 하였으며, Song 등(10)은 flavonols과 flavones 식이 섭취가 인슐린 저항성을 감소시켜서 2형 당뇨병 발생을 예방할 수 있다고 하였다. 녹차(*Camellia sinensis* L.)에는 폴리페놀류인 catechin이 함유되어 있는데, catechin 함량은 수용성 물질의 30~42%를 차지할 정도로 매우 높은 것으로 알려져 있으며, catechin 중 epicatechin(EC), epicatechin-3-gallate(EGC), epigallocatechin(EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등 4가지 함량이 높다(11). Iso 등(12)이 40~65세 연령 17,423명을 5년간 추적하여 연구한 역학조사 결과에 따르면 하루에 녹차 6컵 이상 마시는 사람이 일주일에 1컵 이하로 마시는 사람보다 2형 당뇨병의 발생이 현저히 낮아 녹차 음용이 2형 당뇨병의 발생을 억제하는 효과가 있다고 하였다. 또한 Wolfram 등(13)은 배양세포와 동물을 이용한 실험에서 EGCG가 2형 당뇨병의 예방과 치료에 효과가 있다고 하였고, Ishikawa 등(14)은 catechin이 소장 α -glucosidase를 억제하거나 포도당 흡수를 억제하여 식후 혈당 증가를 저하시키는 작용이 있다고 하였다. 그러나 Fukino 등(15)은 2형 당뇨병 환자에 EGCG를 투여해도 혈당의 감소가 없었다고 하였고, Strobel 등(16)은 지방세포를 이용한 실험에서 EGCG가 glucose transporter 4에 직접 작용하여 포도당의 흡수를 억제한다고 하여 EGCG의 2형 당뇨병 치료 효과에 대해서는 아직 논란이 되고 있다. Gao 등(17)은 대사증후군에서 catechin 단독 투여보다 catechin, 비타민 C 및 비타민 E 등의 병합 투여로 산화 스트레스 감소 효과가 증가한다고 하였고, Chen 등(18)은 비타민 C가 catechin의 안정성을 증가시킨다고 하였다. 당뇨병에서 산화적 손상은 당뇨병 합병증 발생과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려졌으므로 산화 스트레스를 감소시키는 제제의 개발은 당뇨병성 합병증의 예방에 매우 중요한 과제라 할 수 있는데(19), catechin과 비타민 C의 병합 투여가 당뇨병에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다. 본 연구는 녹차 폴리페놀이 당뇨병 치료를 위한 기능성 식품재료로 이용 가능성을 알기 위해서 2형 당뇨병 흰쥐에 녹차 폴리페놀과 비타민 C를 혼합하여 음용시킨 후 혈액과 신장의 생화학적 소견을 비교 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 polyphenon 60(P60)은 catechin 함량이 70%인 녹차 추출물로 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. Sodium ascorbate (SA), streptozotocin(STZ), sodium citrate, γ -glutamyl-nitroanilide, p-nitrophenyl phosphate, 단백질 측정 kit 및 인슐린 측정 kit은 Sigma-Aldrich Co.에서 구매하여 실험에 사용하였다.

실험동물

본 실험에서 사용한 흰쥐는 체중 180~200 g 되는 Sprague-Dawley 중 수컷으로 섀타코(Daejeon, Korea)에서 구매하여 12시간 명암 주기, 온도 20±2°C, 상대습도 60±5%의 환경에서 사육하였고, 45% 고지방 식이는 섀타코에서 구매하여 실험동물에 공급하였다. 동물실험은 조선대학교 동물실험 윤리위원회 승인(승인번호: CIACUC2015-A0003)을 받아 윤리 규정에 따라서 실험을 실시하였다. 2형 당뇨병의 유발은 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신을 사용하여 유발하였다. 실험동물에 45% 고지방 식이를 공급하여 4주일간 사육한 후 당뇨군에는 STZ를 0.05 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 흰쥐(STZ 35 mg/kg BW)의 복강에 주사하였고, 대조군은 0.05 M citrate buffer를 복강에 주사하였다. STZ 주사 후부터 실험동물은 일반 실험동물 사육 사료를 공급하여 사육하였다. 실험군은 대조군(non-diabetic control: NC 군), 당뇨 대조군(diabetic control: DC 군), 당뇨+녹차 폴리페놀(DM+P60) 군, 당뇨+비타민 C(DM+SA) 군 및 당뇨+녹차 폴리페놀+비타민C(DM+P60+SA) 군 등 총 5군으로 나누었고, 각 실험군의 동물 수는 5마리로 하였다. NC 군과 DC 군은 식수로 수돗물을 공급하였고, DM+P60 군은 수돗물에 P60을 0.1%(w/v) 농도로, DM+SA 군은 수돗물에 SA를 0.1%(w/v) 농도로 용해시켜서 식수로 공급하였으며, DM+P60+SA 군은 P60과 SA가 각각 0.1%(w/v) 농도가 되도록 용해된 물을 식수로 공급하여 16주일 동안 사육하였다.

혈액 채취 및 분석

실험동물을 실험 시작 후 2주 간격으로 공복 혈당을 측정하였다. 공복 혈당은 동물을 12시간 금식시킨 후 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당 측정기 ACCU-CHEK(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용해 측정하였다. 실험동물은 에테르로 마취시켜 개복 후 복부 정맥에서 혈액을 채취하고, 신장을 절제하였다. 채취된 혈액의 일부는 즉시 혈장을 분리하여 인슐린을 측정하고, 나머지는 응고시킨 후 혈청을 분리하여 중성지질, BUN 및 creatinine 정량 시료로 사용하였다. 혈장 인슐린은 인슐린 측정 kit(Insulin ELISA kit)을 Sigma-Aldrich Co.에서 구매하여 제조사의 방법에

Table 1. Physical and biochemical parameters of experimental animals

Parameter	NC ¹⁾	DC ²⁾
Food intake (g/24 h)	12.8±1.6 ^a	19.8±4.0 ^b
Body weight (g)	288.4±18.5	286.2±13.1
FBG ³⁾ (mmol/L)	5.0±0.4 ^a	22.1±1.2 ^b
Plasma insulin (μU/mL)	8.3±0.7	8.1±0.7
HOMA-IR ⁴⁾	1.9±0.2 ^a	8.0±1.0 ^b
Triglyceride (mg/dL)	72.6±5.5 ^a	179.9±19.8 ^b

¹⁾NC: non-diabetic control.

²⁾DC: diabetic control.

³⁾FBG: fasting blood glucose.

⁴⁾HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. Values are mean±SD (n=5). Means with different letters (a,b) in a same row are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

따라서 반응시킨 후 ELISA plate reader(Tecan, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하여 계산하였다. 혈청 중성지방, BUN 및 creatinine 양은 혈액 자동분석기(Hitachi 7180, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 인슐린 저항성 지수인 homeostasis model assessment for insulin resistance(HOMA-IR)는 Matthews 등(20)의 방법에 따라서 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{Insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glucose (mmol/L)} / 22.5$$

신장 효소 활성 측정

절제된 신장 조직 0.2 g을 취하여 2 mL의 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.4)을 첨가하여 균질화시킨 후 γ -glutamyl-transpeptidase(GGT)와 alkaline phosphatase(AP) 측정을 위한 시료로 이용하였다. GGT 활성도는 Tate와 Meister (21)의 방법으로 γ -glutamyl-nitroanilide로부터 생성되는 p-nitroanilide 양을 정량하는 방법으로, AP는 Tenenhouse 등(22)의 방법에 따라 p-nitrophenyl phosphate로부터 생성되는 p-nitrophenol 양을 정량하는 방법으로 측정하였고, 단백질은 Sigma-Aldrich Co.의 단백질 정량 kit(total protein kit)을 이용하여 측정하였다. 효소의 활성은 $\mu\text{mol/mg protein/h}$ 로 표시하였다.

통계처리

모든 측정 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였고, 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 시료 간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

흰쥐에서 2형 당뇨병 유발

고지방식이와 저용량 스트렙토조토신으로 유도된 당뇨병 흰쥐의 체중, 식이섭취량 및 생화학적 특성을 관찰한 결과는 Table 1과 같다. DC 군 식이섭취량은 NC 군보다 54%가 증가하였고, 체중은 NC 군과 DC 군 사이에 유의한 차이가 없었다. DC 군의 공복 혈당은 22.1±1.2 mmol/L로 NC 군의 5.4±0.4 mmol/L에 비하여 약 4배가 증가하였고, 혈장 인슐린은 NC 군 8.3±0.7 μU/L, DC 군 8.1±0.7 μU/L로 두 군 간에 차이가 없었으며, 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR은 NC 군에서 1.9±0.2, DC 군은 8.0±1.0으로 DC 군에서 높게 나타났고, 중성지방량은 DC 군에서 NC 군보다 약 2.5배가 증가하였다. 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신 투여는 2형 당뇨병 유발에 이용되고 있는데(23,24), 본 실험에서는 DC 군에서 공복 혈당이 증가하고 혈장 인슐린의 양은 변화가 없었으며, 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR이 DC 군에서 높게 나타나 2형 당뇨병이 유발된 것으로 사료된다.

P60과 SA 투여 2형 당뇨병 흰쥐의 생리적 및 혈액소견

녹차 폴리페놀과 비타민 C가 2형 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하기 위해 P60과 SA를 당뇨병 흰쥐에 16주간 투여한 후 관찰한 식이섭취량, 음수량, 체중 및 혈액소견 결과는 Table 2와 같다. 식이섭취량과 음수량은 NC 군에 비하여 DC 군에서 30%와 137%가 각각 증가하여 당뇨병 발생으로 인하여 식이섭취량과 음수량이 증가함을 알 수 있었다. 당뇨병 흰쥐에 P60이나 SA를 투여한 군과 투여하지 않은 군

Table 2. Effect of polyphenon 60 (P60) and sodium ascorbate (SA) on physical and biochemical parameters in experimental animals

Parameter	NC	DC	DM+P60 ¹⁾	DM+SA ²⁾	DM+P60+SA ³⁾
Food intake (g/24 h)	21.6±2.4 ^a	28.2±2.7 ^b	29.6±1.3 ^b	29.4±1.1 ^b	29.4±1.7 ^b
Fluid intake (mL/24 h)	18.0±3.3 ^a	42.8±3.8 ^b	46.0±6.4 ^b	42.6±3.3 ^b	43.6±3.6 ^b
Body weight (g)	357.6±14.4	369.0±25.7	356.2±14.8	365.8±22.1	355.6±17.8
FBG (mmol/L)	4.9±0.6 ^a	24.5±1.4 ^d	21.1±1.2 ^c	23.5±1.4 ^{cd}	17.4±1.5 ^b
Plasma insulin (μU/mL)	8.2±0.9	7.9±0.8	7.9±0.8	7.6±0.6	7.8±0.6
HOMA-IR	1.8±0.3 ^a	8.6±0.5 ^c	7.7±0.8 ^c	7.9±0.7 ^c	6.1±0.7 ^b
Triglyceride (mg/dL)	77.4±8.9 ^a	192.2±13.8 ^d	151.8±12.4 ^c	183.4±16.1 ^d	111.8±16.5 ^b

¹⁾DM+P60: diabetic rats treated with P60 (0.1% in drinking water).

²⁾DM+SA: diabetic rats treated with SA (0.1% in drinking water).

³⁾DM+P60+SA: diabetic rats treated with P60 and SA (0.1% P60 and 0.1% SA in drinking water).

Values are mean±SD (n=5). Means with different letters (a-d) in a same row are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

사이에 식이섭취량과 음수량의 차이가 없었고, 체중은 각 실험군들 사이에 유의한 차이가 없었기 때문에 녹차 폴리페놀이나 비타민 C 투여가 식이섭취량이나 음수량 및 체중에 미치는 영향은 적은 것으로 사료된다. 공복 혈당은 DC 군에서 NC 군의 5배로 증가하였고, DM+ P60 군은 DC 군보다 14% 감소하였고, DM+ P60+ SA 군은 DC 군에 비하여 28% 정도 감소하였으며, DM+ SA 군은 DC 군과 유의한 차이가 없어서 녹차 폴리페놀이나 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여로 혈당의 감소가 일어남을 알 수 있었다. 혈청 인슐린 양은 각 실험군 사이에 유의한 차이가 없으며, 인슐린저항성 지수인 HOMA-IR은 DC 군에서 8.6 ± 0.5 였고, DM+ P60+ SA 군은 6.1 ± 0.7 로 DC 군보다 유의하게 감소하였으며, DM+ P60 군과 DM+ SA 군은 DC 군과 유의한 차이가 없었다. 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여로 공복 혈당과 HOMA-IR이 유의하게 감소하여 2형 당뇨병에서 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여가 혈당과 인슐린 저항성 개선에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각한다. 혈장 중성지방량은 NC 군에 비하여 DC 군에서 2.4배가 증가하였으며, DM+ P60 군은 DC 군보다 21% 감소하였고, DM+ P60+ SA 군은 DC 군에 비하여 42% 정도 감소하였으며, DM+ SA 군은 DC 군과 유의한 차이가 없어서 녹차 폴리페놀이나 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여로 혈액 중성지방량의 감소가 일어나며 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여로 중성지방 감소량이 더 크게 나타남을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과 2형 당뇨병에서 혈당, 인슐린 저항성 및 혈청 중성지방량 개선에 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여가 녹차 폴리페놀이나 비타민 C 단독 투여보다 더 큰 효과를 나타내는 것으로 생각한다.

P60과 SA 투여 2형 당뇨병 흰쥐의 공복 혈당 변화

녹차 폴리페놀과 비타민 C가 2형 당뇨병의 공복 혈당에 미치는 영향을 관찰하기 위해 P60과 SA를 당뇨병 흰쥐에 투여하면서 16주간 공복 혈당을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. NC 군의 공복 혈당은 실험 시작할 때인 0주에 91 ± 11 mg/dL였으며 16주까지 유의한 변화를 나타내지 않았고, DC 군은 0주에 공복 혈당이 397 ± 22 mg/dL였으며 16주까지 변화가 없었다. DM+ P60 군 공복 혈당은 0주 397 ± 18 mg/dL였으며 8주와 16주에 DC 군보다 각각 10% 및 12%가 감소하였고 4주와 12주에는 DC 군과 유의한 차이를 나타내지 않았으며, DM+ SA 군 공복혈당은 0주에서 16주까지 DC 군과 유의한 차이가 없었다. DM+ P60+ SA 군 공복 혈당은 DC 군에 비하여 4주 18%, 8주 27%, 12주 29% 및 16주 31%가 감소하였다. Nagao 등(25)은 2형 당뇨병 환자를 대상으로 12주간 녹차 catechin을 투여하면 혈당이 134.1 ± 5.6 mg/dL에서 약 8 mg/dL 정도 감소한다고 하였고, Wein 등(26)은 당뇨병 생쥐 모델인 db/db mice에 P60 0.1 g/kg을 4주간 투여하였을 때 혈당의 변화가 없다고 하여, 녹차 폴리페놀 단독 투여에 의한 혈당의 감소량은 크지

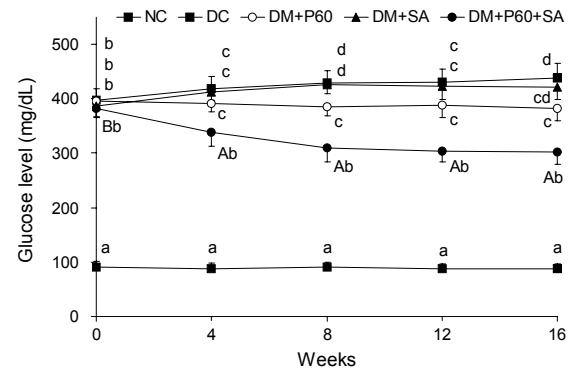


Fig. 1. Effects of polyphenon 60 (P60) and sodium ascorbate (SA) on fasting blood glucose in diabetic rats. Rats were administered P60 and SA for 16 weeks, the fasting blood glucose were determined after 12 h fasting. NC, non-diabetic control; DC, diabetic control; DM+P60, diabetic rats treated with P60 (0.1% in drinking water); DM+SA, diabetic rats treated with SA (0.1% in drinking water); DM+P60+SA, diabetic rats treated with P60 and SA (0.1% P60 and 0.1% SA in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Means with different capital letters (A,B) are significantly different ($P < 0.05$) in DM+P60+SA group. Means with different small letters (a-d) are significantly different ($P < 0.05$) at same weeks.

않은 것으로 생각한다. 녹차 폴리페놀은 소화 효소인 amy-lase나 α -glycosidase 작용을 억제하거나 포도당 흡수 억제, 포도당 신생 억제 작용 등 여러 가지 작용으로 혈당을 감소시키는 것으로 알려졌는데(8,9,13,16), 본 실험의 결과 P60 투여 당뇨병 흰쥐의 공복 혈당량은 8주와 16주에는 10% 내외의 감소가 있었으나 4주와 12주에는 감소가 없어서 녹차 폴리페놀에 의한 혈당 강하 작용이 크지 않으며, 비타민 C가 당뇨병에서 혈당의 변화에 미치는 영향은 적은 것으로 생각된다. 그러나 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여군의 공복 혈당은 당뇨 대조군, 녹차 폴리페놀이나 비타민 C 단독 투여군에 비하여 모두 감소하여 2형 당뇨병에서 녹차 폴리페놀과 비타민 C가 혈당 강하에 상승작용을 나타내는 것으로 사료된다. 비타민 C와 녹차 폴리페놀의 혈당 강하 상승효과에 대한 명확한 기전은 아직 알려지지 않으며, Chen 등(18)은 비타민 C가 폴리페놀의 안정성을 증가시키는 작용이 있다고 하였는데, 이러한 폴리페놀 안정성 증가도 효과 증가의 한 요인으로 작용할 수 있을 것으로 추측되며, 비타민 C와 폴리페놀의 혈당 강하 상승작용 기전과 용량에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각한다.

P60과 SA 투여 2형 당뇨병 흰쥐의 신장 손상에 미치는 영향

녹차 폴리페놀과 비타민 C가 2형 당뇨병 흰쥐의 신장에 미치는 영향을 관찰하기 위해 당뇨병 흰쥐에 P60과 SA를 16주 동안 투여한 후 혈청 creatinine, BUN 양과 신장 효소 GGT와 AP 활성도를 측정된 결과는 Fig. 2, 3 및 Table 3과 같다. 혈청 creatinine 양은 DC 군에서 NC 군보다 284%가 증가한 1.23 ± 0.12 mg/dL였고, DM+ SA 군은 DC 군과 차

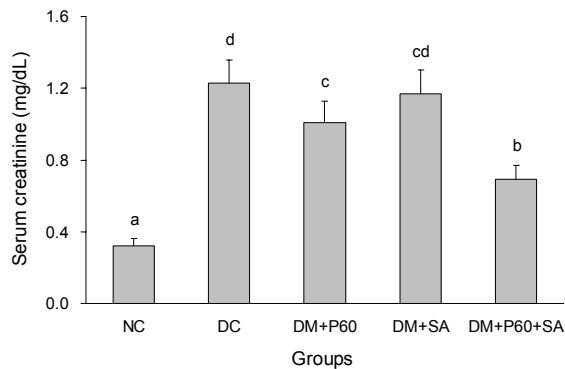


Fig. 2. Effects of P60 and SA on serum creatinine in diabetic rats. Rats were administered P60 and SA for 16 weeks, the serum creatinine were determined after these treatments. NC, non-diabetic control; DC, diabetic control; DM+P60, diabetic rats treated with P60 (0.1% in drinking water); DM+SA, diabetic rats treated with SA (0.1% in drinking water); DM+P60+SA, diabetic rats treated with P60 and SA (0.1% P60 and 0.1% SA in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

이를 나타내지 않았으며, DM+ P60 군의 creatinine 양은 DC 군보다 17% 감소하였고, DM+ P60+ SA 군은 0.69 ± 0.08 mg/dL로 DC 군보다 43% 감소하였다. 혈청 BUN 양은 DC 군에서 NC 군보다 184%가 증가한 81.96 ± 6.46 mg/dL였고, DM+ P60 군과 DM+ SA 군은 DC 군과 유의한 차이를 나타내지 않았으며, DM+ P60+ SA 군의 BUN 양은 DC 군보다 41% 정도가 감소한 48.38 ± 7.55 mg/dL였다. 혈청 BUN과 creatinine 양은 신장 기능을 나타내는 소견으로서 시스플라틴과 같은 항암제에 의한 신장 손상이나(27) 당뇨병성 신장 손상이 나타나면 증가하는 것으로 알려졌는데(28), 본 실험 결과에서도 DC 군의 혈청 BUN과 creatinine 양이 증가하여 신장 손상이 나타남을 알 수 있었다. Khan 등(27)은 항암제 시스플라틴에 의한 신장 독성이 녹차 추출물에 의해서 억제된다고 하였고, Ahad 등(28)은 항산화 물질인 ellagic acid가 2형 당뇨병 흰쥐에서 신장 손상을 억제한다고 하였는데, 본 실험에서 당뇨병 흰쥐에 P60을 단독 투여한 경우 creatinine은 감소하지만 BUN은 변화가 없고, P60과 SA를 복합 투여했을 때 creatinine이나 BUN의 증가를 억제하기 때문에 신장 손상 방지 효과가 더 클 것으로 생각된다. GGT와 AP는 신장 세뇨관의 술가장자리 막(brush border membrane)에 많이 존재하는 효소로서 세뇨관 손상

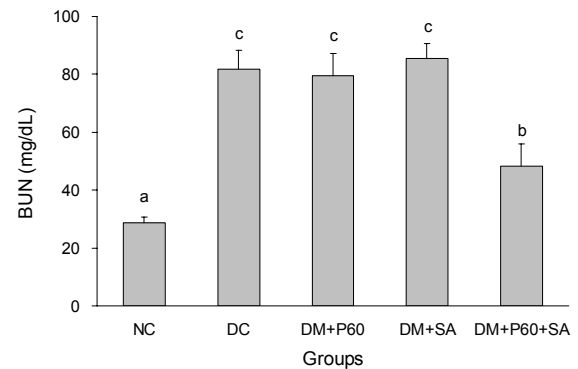


Fig. 3. Effects of P60 and SA on blood urea nitrogen (BUN) in diabetic rats. Rats were administered P60 and SA for 16 weeks, the BUN were determined after these treatments. NC, non-diabetic control; DC, diabetic control; DM+P60, diabetic rats treated with P60 (0.1% in drinking water); DM+SA, diabetic rats treated with SA (0.1% in drinking water); DM+P60+SA, diabetic rats treated with P60 and SA (0.1% P60 and 0.1% SA in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

시 감소하는 것으로 알려졌다(22,27). 본 실험에서 DC 군의 신장 GGT와 AP 활성도는 NC 군보다 감소하여 DC 군에서 신 세뇨관 손상이 나타나고 있음을 보여주고 있다. 녹차 추출물이 시스플라틴이나 gentamycin에 의한 신장 GGT와 AP 활성도 감소를 억제하는 작용이 있는 것으로 알려졌는데(27,29), 본 실험에서 DM+ P60+ SA 군의 신장 GGT와 AP 활성도는 DC 군보다 증가하여 당뇨병 흰쥐에 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여로 신장 손상이 억제됨을 보여주고 있다. Groebler 등(30)은 비타민 C와 폴리페놀을 복합 투여하면 산화적 손상을 억제할 수 있다고 하였고, Gaede 등(31)은 2형 당뇨병 환자에 비타민 C와 비타민 E를 복합 투여하면 알부민뇨증의 개선에 도움이 된다고 하였는데, 본 실험에서도 녹차 폴리페놀과 비타민 C의 복합 투여로 녹차 폴리페놀이나 비타민 C를 단독으로 투여하였을 때보다 신장 손상의 억제 효과가 더 증가함을 확인할 수 있었다. 녹차 폴리페놀과 비타민 C의 신장 손상 억제 효과는 2형 당뇨병 환자에서 초래될 수 있는 당뇨병성 신장 합병증의 예방에 작용할 가능성이 있으므로 이에 대한 계속된 연구가 필요하며, 당뇨병 환자에서 신장 합병증을 예방할 수 있는 식품 보조제로서 개발 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Table 3. Effects of P60 and SA on enzyme activities in kidney of diabetic rats

Enzymes ¹⁾	Enzyme activities (μ moles/mg protein/h)				
	NC	DC	DM+P60	DM+SA	DM+P60+SA
GGT	47.8 ± 4.6^c	34.5 ± 3.0^a	41.5 ± 3.6^b	36.6 ± 5.2^{ab}	44.2 ± 4.0^{bc}
AP	15.8 ± 1.5^b	11.7 ± 1.2^a	13.6 ± 0.5^{ab}	11.5 ± 0.5^a	14.4 ± 1.2^b

¹⁾GGT: γ -glutamyltranspeptidase, AP: alkaline phosphatase.

Values are mean±SD (n=5). Means with different letters (a-c) in a row are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

요 약

녹차 폴리페놀과 비타민 C가 2형 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하기 위해 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신을 이용하여 당뇨병이 유도된 흰쥐에 polyphenon 60(P60)과 sodium ascorbate(SA)를 16주간 투여한 후 공복 혈당, 혈장 인슐린, 혈청 중성지방, BUN 및 creatinine과 신장 GGT와 AP 활성도를 측정하였다. 당뇨병 흰쥐에 P60이나 SA 투여로 인한 식이섭취량과 체중의 변화는 없었다. 공복 혈당은 당뇨 대조군(DC 군)에서 대조군(NC 군)의 5배로 증가하였으며, 당뇨+녹차 폴리페놀(DM+P60) 군은 14%, 당뇨+녹차 폴리페놀+비타민 C(DM+P60+SA) 군은 28%가 DC 군보다 감소하였고, 당뇨+비타민 C(DM+SA) 군은 DC 군과 유의한 차이가 없었다. 혈장 인슐린 양은 각 실험군 사이에 유의한 차이가 없으며, 인슐린 저항성 지수 HOMA-IR은 DC 군에서 증가하였고 DM+P60+SA 군은 DC 군보다 감소하였다. 혈청 creatinine 양은 DC 군에서 증가하였고 DM+P60 군은 DC 군보다 17% 감소하였으며, DM+P60+SA 군은 DC 군보다 43% 감소하였다. 혈청 BUN 양은 DC 군에서 증가하였고 DM+P60+SA 군은 DC 군보다 41% 감소하였다. 신장 GGT와 AP 활성도는 DC 군에서 감소하였고 DM+P60+SA 군은 DC 군보다 감소가 적었으며, DM+SA 군은 DC 군과 유의한 차이가 없었다. 이상의 실험 결과 2형 당뇨병에서 녹차 폴리페놀과 비타민 C 복합 투여가 혈당, 인슐린 저항성 및 혈청 중성지방량 개선 및 신장 손상 방지 효과가 녹차 폴리페놀이나 비타민 C를 단독으로 투여하였을 때보다 더 증가함을 확인할 수 있었다. 녹차 폴리페놀과 비타민 C의 혈당 상승 억제와 신장 손상 방지 효과에 대한 계속된 연구가 필요하며, 녹차 폴리페놀과 비타민 C는 당뇨병 환자에게 혈당을 조절하고 신장 손상을 방지하는 기능성 식품 제제로서 개발 가능성이 있는 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. International Diabetes Federation. 2014. *IDF diabetes atlas*. 6th ed. Brussels, Belgium. p 7-17.
2. Akkati S, Sam KG, Tungha G. 2011. Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol* 51: 796-804.
3. Philippe J, Raccah D. 2009. Treating type 2 diabetes: how safe are current therapeutic agents?. *Int J Clin Pract* 63: 321-332.
4. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 24: 1777-1789.
5. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747.
6. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. 2005. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food* 8: 281-290.
7. Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S-325S.
8. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 11: 1365-1402.
9. Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. 2012. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr* 95: 925-933.
10. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. 2005. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J Am Coll Nutr* 24: 376-384.
11. Wang Y, Ho CT. 2009. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 57: 8109-8114.
12. Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Takamashi A; JACC Study Group. 2006. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med* 144: 554-562.
13. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, Weber P. 2006. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr* 136: 2512-2518.
14. Ishikawa A, Yamashita H, Hiemori M, Inagaki E, Kimoto M, Okamoto M, Tsuji H, Memon AN, Mohammadio A, Natori Y. 2007. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 166-173.
15. Fukino Y, Shimbo M, Aoki N, Okubo T, Iso H. 2005. Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 335-342.
16. Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. 2005. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 386: 471-478.
17. Gao M, Zhao Z, Lv P, Li Y, Gao J, Zhang M, Zhao B. 2015. Quantitative combination of natural anti-oxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. *Redox Biol* 6: 206-217.
18. Chen ZY, Zhu QY, Wong YF, Zhang Z, Chung HY. 1998. Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *J Agric Food Chem* 46: 2512-2516.
19. Forbes JM, Cooper ME. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93: 137-188.
20. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.
21. Tate SS, Meister A. 1985. γ -Glutamyl transpeptidase from kidney. In *Methods in Enzymology*. Meister A, ed. Academic Press, New York, NY, USA. Vol 113, p 400-437.
22. Tenenhouse HS, Scriver CR, Vizel EJ. 1980. Alkaline phosphatase activity does not mediate phosphate transport in the renal-cortical brush-border membrane. *Biochem J* 190: 473-

- 476.
23. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. 2000. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 49: 1390-1394.
 24. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 52: 313-320.
 25. Nagao T, Meguro S, Hase T, Otsuka K, Komikado M, Tokimitsu I, Yamamoto T, Yamamoto K. 2009. A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity* 17: 310-317.
 26. Wein S, Schrader E, Rimbach G, Wolffram S. 2013. Oral green tea catechins transiently lower plasma glucose concentrations in female db/db mice. *J Med Food* 16: 312-317.
 27. Khan SA, Priyamvada S, Khan W, Khan S, Farooq N, Yusufi AN. 2009. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 60: 382-391.
 28. Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA. 2014. Ellagic acid, an NF- κ B inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy. *Chem Biol Interact* 219: 64-75.
 29. Khan SA, Priyamvada S, Farooq N, Khan S, Khan MW, Yusufi AN. 2009. Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacol Res* 59: 254-262.
 30. Groebler LK, Wang XS, Kim HB, Shanu A, Hossain F, McMahon AC, Witting PK. 2012. Cosupplementation with a synthetic, lipid-soluble polyphenol and vitamin C inhibits oxidative damage and improves vascular function yet does not inhibit acute renal injury in an animal model of rhabdomyolysis. *Free Radic Biol Med* 52: 1918-1928.
 31. Gaede P, Poulsen HE, Parving HH, Pedersen O. 2001. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 18: 756-760.