

β-Carotene 첨가식이가 당뇨쥐의 지질과산화물 수준과 항산화효소 활성에 미치는 영향*

이 완 희 · 천 종 희[§]

인하대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of β-Carotene Supplementation on Lipid Peroxide Levels and Antioxidative Enzyme Activities in Diabetic Rats*

Lee, Wan-Hee · Chyun, Jong-Hee[§]

Department of Food & Nutrition, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

This study investigated the effect of dietary β-carotene supplementation on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity as indices of oxidative stress in diabetic rats. Fifty Sprague-Dawley male rats aging 7 weeks were used as experimental animals, which were divided into the non-diabetic control group and the diabetic group. The diabetic group received an intraperitoneal injection with streptozotocin to induce diabetes. Then the diabetic rats were divided into four dietary groups which contained different amounts of β-carotene ; 0%, 0.002%, 0.02%, or 0.2% of the diet. The diabetic rats were fed the experimental diets and the non-diabetic rats were fed the basal diet without β-carotene supplementation for 2 weeks and then sacrificed. The diabetic group had a significantly higher blood glucose level than the non-diabetic group. However, blood glucose level were not significantly changed by the level of dietary β-carotene supplementation. Compared to the non-diabetic control group, the diabetic control group indicated a significant increase of plasma thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). Liver TBARS level also tended to be higher in diabetic control group, although it was not significant. The β-carotene supplementation did not reduce plasma TBARS level. However, Liver TBARS level was significantly decreased when 0.02% or more β-carotene was supplemented in the diet. The liver lipofuscin level in the diabetic control group was higher than in the non-diabetic control group, but the effect of β-carotene supplementation did not show any differences. Superoxide dismutase activity was significantly lower in the diabetic group, but it was increased in groups receiving 0.02% or more β-carotene. Compared to the non-diabetic control group, lower activities of catalase and glutathione peroxidase were observed in the diabetic control group, although it was not significant. Catalase and glutathione peroxidase activities tended to increase as the levels of β-carotene supplementation increased, although it was not statistically significant. Therefore, it seems that dietary β-carotene supplementation might reduce diabetic complications by partly decreasing the lipid peroxidation and increasing the activity of antioxidative enzyme in diabetes. (*Korean J Nutrition* 36(7): 675~683, 2003)

KEY WORDS : β-carotene, diabetes, lipid peroxides, antioxidative enzymes.

서 론

당뇨병은 고혈당과 당뇨 증세가 나타나는 대사이상 질환이다. 이는 체장에서 분비되는 혈당 조절 호르몬인 인슐린의 양이나 기능이 부족한 질환으로 여러 기관에 영향을 주

어 당뇨성 망막증, 신장병, 동맥경화, 고혈압, 말초 신경 장애, 고지혈증, 심혈관계 질환등의 만성 당뇨 합병증을 일으킨다.^{1,2)}

당뇨병으로 인한 만성 퇴행성 질환의 발생기전은 확실하게 밝혀지지는 않았으나 최근의 연구에서 이러한 당뇨의 합병증에 산화적 스트레스가 관여한다는 결과가 주목을 끌고 있다.^{3,4)}

인체는 정상적인 생리 상태에서는 자유 라디칼 (free radical)의 생산과 항산화 방어체계 (antioxidant defense system)의 활성이 균형을 이루고 있다.^{4,5)} 체내에서 자유

접수일 : 2003년 5월 9일

채택일 : 2003년 7월 8일

*This study was supported by 2001 research grant of Inha University.

[§]To whom correspondence should be addressed.

라디칼이 과다 생성되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되어 균형이 깨어지면 산화적 스트레스가 일어난다.⁶⁾ 당뇨병 환자에서 산화적 스트레스가 증가되는 주요 원인은 비효소적 당화반응과 자동산화적 당화반응의 증가와 항산화 방어체계의 손상 등으로 추측하고 있다.^{3,7)}

체내 항산화 방어체계에는 항산화효소 이외에 항산화 작용을 하는 비타민 E, 비타민 C, β -carotene 등의 비타민이 역할을 하고 있다. 이러한 비타민들은 자연계에 널리 분포하여 쉽게 식품으로 섭취할 수 있는 대표적인 영양소들이다.⁸⁾ 또한 미량원소인 셀레늄, 아연등도 항산화작용을 갖는 것으로 알려져 있다.

β -carotene을 포함한 일부 carotenoids는 단일 산소를 제거시키는 능력이 있고 특히 지질과산화에 관련되는 과산화 라디칼을 직접 저지시키는 항산화 기능이 있음이 보고되었다. 한편 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 쥐에서 β -carotene의 투여가 신장의 항산화 방어체계를 향상시키고 과산화지질의 생성을 억제시키는데 효과적임이 보고되었다.^{9,10)} David 등은 제2형 당뇨병환자는 혈청 carotene의 농도가 정상인보다 유의하게 낮으며 혈청 Vit E, β -carotene농도가 당뇨병성 백내장과 관련된다고 보고하였다.¹⁰⁾

β -carotene이 여러 질병을 예방하는 작용기전으로는 retinoid로의 전환, 산화적 손상로부터의 보호작용, β -carotene 분자자체의 생리적 활성등을 생각할 수 있다.¹¹⁾ β -carotene은 free radical scavenger로써 지질산화의 연쇄반응을 중단시킨다. 즉 β -carotene이 반응성이 강한 과산화기와 반응하여 유해하지 않은 비활성 부산물을 생성함으로써 과산화기와 불포화지방이 반응하여 손상을 초래하는 것을 막는다.¹²⁾ 또한 β -carotene은 생체내에서 singlet oxygen quencher로서 가장 강력한 활성을 갖고 있다.^{12,13)} Singlet oxygen은 세포기능에 필수적인 특수한 효소를 불활성화 시키고 반응성이 더 높고 치명적인 수산화기를 발생시키는 작용으로 세포에 독성을 준다. β -carotene은 이런 singlet oxygen과 반응하여 에너지가 높은 β -carotene분자를 생성하며 이때의 에너지는 열형태로 단순히 발산시킨다. 특히 β -carotene은 낮은 산소분압에서 활성을 가지므로¹⁴⁾ 말초조직등의 생리적 조건하에서 더욱 효율적으로 작용한다.¹⁵⁾ 이는 β -carotene은 대혈관 합병증보다는 미세혈관 합병증인 당뇨병성 신증, 신경병증 및 망막증에 더 효과적인 항산화작용이 있다는 연구결과에서도 볼 수 있다.^{8,10)}

몇몇의 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 β -carotene이 지질의 과산화를 감소시킨다는 것이 증명되었다. 또한 β -carotene

의 항산화성은 부분적으로 암, 동맥경화증, 관절염, 백내장 같은 질병을 유발시키는 산화적 스트레스로부터 방어하는데 중요하게 작용한다.¹⁵⁾ 아직 당뇨병에서 β -carotene의 역할에 대한 연구는 많지 않으나 β -carotene은 singlet oxygen quencher로 작용하고 자유 라디칼의 생성을 억제하는 등의 강력한 항산화 능력을 가지므로 당뇨 합병증의 예방 또는 지연에도 역할을 할 것으로 기대되어진다. 그러나 Liu 등¹⁶⁾은 건강한 성인을 대상으로 12년 간 β -carotene을 50 mg/alternate days를 주고 오랜기간 동안의 β -carotene 섭취가 인슐린 비의존성 당뇨병 발생 위험을 줄이는지에 대한 실험결과 β -carotene의 당뇨병 예방효과가 없다고 보고하였다.

생체내의 산화적 스트레스 상태는 지질과산화물과 free radical scavenger, 항산화효소 활성의 변화를 통해 간접적으로 판단할 수 있다.

일부 임상연구나 동물실험 연구결과 당뇨병군은 높은 산화적 스트레스를 받고 있음이 보고되었으나 당뇨병성 합병증 환자에서의 과산화지질의 정도나 항산화효소 활성에 관한 연구, 그리고 당뇨병 환자에 있어서 β -carotene의 효과에 관한 연구는 매우 드문 편이다.

따라서 본 실험에서는 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 Sprague-Dawley계 흰쥐에게 dose를 달리한 β -carotene 첨가식을 공급하여 산화적 스트레스 감소에 있어서 β -carotene의 유용성을 알아보고자 하였다. 또한 β -carotene 보충 없이 basal diet만 공급받는 비당뇨 대조군과 당뇨대조군을 비교하여 당뇨자체가 산화적 스트레스 증가에 주는 영향도 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

실험동물로는 생후 5주된 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐 50마리를 구입 후 첫 1주는 pellet 형태의 표준 사료와 물을 *ad libitum*으로 공급하여 실험실 환경에 적응시켰고, 다음 1주는 본 실험에서 사용할 식이 형태에 적응시키기 위해 β -carotene을 첨가하지 않은 기본실험식을 한천을 사용하여 gel 형태로 만들어 공급하여 적응시킨 뒤, 7주령이 되어 체중이 약 225~250 g이 되었을 때 실험에 사용하였다.

실험식의 조성은 Table 1과 같고, 실험군에 따라 β -carotene을 0%, 0.002%, 0.02%, 0.2% 첨가하여 제조하였다. 본 실험에 사용한 식이는 섭취시 먹이의 흘림을 줄이기 위해 모두 한천을 사용하여 gel 형태로 만들어 공급하였

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	NO / DO	DL	DM	DH
Casein	200	200	200	200
DL-methionine	3	3	3	3
Corn oil	50	50	50	50
Corn starch	490	490	490	490
Sucrose	160	160	160	160
α -cellulose	50	50	50	50
Vitamin mixture ¹⁾	10	10	10	10
Mineral mixture ²⁾	35	35	35	35
Choline bitartrate	2	2	2	2
β -carotene	0	0.02	0.2	2

1) Composition of vitamin mixture:
 1.0% in diet provide the following vitamins (mg/kg diet)
 Thiamin HCl 6 mg, Riboflavin 6 mg, Nicotinic acid 30 mg, Calcium pantothenate 16 mg, Folic acid 2 mg, Cyanocobalamin 10 μ g, Biotin 0.2 mg, Vitamin A 4000 I.U., Vitamin D 1000 I.U., Vitamin E 50 I.U., Vitamin K 50 μ g, Pyridoxine HCl 7 mg
 2) Composition of mineral mixture:
 3.5% in diet provided the following mineral (mg/kg diet)
 Calcium (calcium phosphate, dibasic) 5200, Phosphorus (calcium phosphate, dibasic) 4000, Sodium (sodium chloride) 1020, Potassium (potassium citrate · H₂O) 3600, Magnesium (magnesium oxide) 500, Manganese (manganese carbonate) 54, Iron (ferric chloride) 35, Copper (cupric carbonate) 6, Zinc (zinc carbonate) 30, Iodine (potassium iodine) 0.2, Selenium (sodium selenite · 5H₂O) 0.1, Chromium (chrome potassium sulfate · 12H₂O) 2.0, Chloride (sodium chloride) 1560, Sulfate (potassium sulfate) 1000

다. Gel을 만들기에 적당한 한천의 농도는 1%정도¹⁷⁾라고 하므로 본 연구에서는 예비실험을 거쳐 식이 : 한천 : 물은 490g : 10g : 1000g의 비율로 하여 식이를 gel 형태로 제조하였다.

2. 실험 설계 및 당뇨 유도

구입 후 기본실험식으로 적응기간을 거친 실험동물이 생후 7주가 되었을 때 당뇨군 (40마리)과 비당뇨군 (10마리)으로 나누어 16시간 금식시킨 후 당뇨군에는 streptozotocin (Sigma, U.S.A, 65 mg/kg체중)을 0.07M citrate buffer (pH 4.5)에 녹여 10~15분내에 복강에 1회 주사하여 당뇨를 유도하였다. 비당뇨군의 쥐에게는 citrate buffer를 같은 수준으로 주사하였다. 총 주사액의 용량은 0.4~0.5 ml정도로 조정하였다. 당뇨 유도 3일 후 꼬리의 정맥혈을 취하여 혈당을 측정하고 혈당 농도 300 mg/dl을 기준으로 하여 그 이상인 경우에만 당뇨가 유도된 것으로 간주하였다.²⁾ 당뇨를 확인한 후 다시 식이의 β -carotene 양에 따라 당뇨군내에서 0% β -carotene군 (DO), 0.002% β -carotene군 (DL), 0.02% β -carotene (DM)군, 0.2% β -carotene (DH)군 등 4식이군으로 나뉘어 실험식이를 2주간 공급하였다. 비당뇨 대조군 (NO)에게는 계속 기본실험식이를 공급하였다. 모든 동물에게 실험식이는 매일 새로

운 것을 20g (gel 형태로 55g)씩 주었고 물은 마음껏 먹게 하였으며 전날의 식이 섭취량은 매일 측정하였고 체중은 매주 한번씩 측정하였다.

사육실의 환경은 실내온도 20~22℃, 명암주기 12시간 cycle (light 6 : 00~18 : 00)로 유지하였다.

3. 시료수집 및 전처리

실험동물을 희생시키기 전 16시간동안 금식을 시키고, ether로 마취시킨 뒤 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취하여 혈장을 분리하였고 분리된 혈장은 즉시 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 분석에 사용하였다.

혈액을 채취한 즉시 간조직을 적출하여 차가운 생리 식염수에 세척한 후 여과지로 여분의 물기를 제거하고 간조직의 무게를 측정한 다음 액체질소로 급속 냉동시킨 후 -70℃에 냉동보관하였다.

약 1 g의 간을 가위로 잘게 자른 후 4배 용량의 냉각된 tris buffer를 넣어 간조직을 균질화 하고, 이 균질액을 1,000 × g에서 10분간 원심분리하여 그 상층액으로부터 TBARS, lipofuscin, conjugated diene, 총지질 함량을 측정하였다.

약 2 g의 간을 잘게 다진 후 ice-cold homogenizing media (154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA buffer, pH 7.4)를 넣고 4℃에서 homogenizer (Potters, B.braun, Germany)로 균질화한 다음, 4℃, 1,000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 세포조각들 (cell debris)을 제거하고 지방이 들어가지 않도록 조심하여 상층액을 모아 4℃, 10,000 × g에서 20분간 원심분리하였다. Mitochondria층 (pellet)은 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 재부유시켜서 액체질소로 급속냉동한 다음 냉동보관하였고 다시 상층액을 모아서 4℃, 100,000 × g에서 60분간 다시 원심분리하여 cytosol층 (상층액)과 microsome층 (pellet)으로 분리하였다. Cytosol층과 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 재부유시킨 microsome층은 액체질소로 급속 냉동한 다음 -70℃에서 냉동보관하였다.

간조직의 cytosol에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR)의 활성도를, mitochondria에서는 catalase의 활성도를 각각 측정하였다.

4. 분석 방법

1) 혈장과 간의 TBARS 측정

혈장 TBARS는 2-thiobarbituric acid 방법에 의해 측

정하였다.^{18,19} 간 균질액에서 지질과산화물의 측정은 thio-barbituric acid (TBA)법을 이용하여 생성된 TBARS의 양을 측정하였다.²⁰

2) 간 Lipofuscin, conjugated diene 측정

간 균질액에서 지방을 추출한 후 그 추출액에서 lipofuscin 및 conjugated diene의 함량을 측정하였다.²¹⁻²³ Lipofuscin은 spectrofluorometer를 이용하여 excitation wavelength 380 nm, emission wavelength 480nm로 형광도를 측정하였고, conjugated diene의 측정은 Recknagel & Glende의 방법²⁰을 이용하였다.

3) 항산화효소 활성도 측정

간의 cytosol에서 SOD의 활성은 Misra and Fridorich의 방법²⁴을 이용하였다. 간의 mitochondria에서 catalase 활성도는 Aebi의 방법²⁵을 이용하여 측정하였다. 간의 cytosol에서 GPx 활성도는 Tappel 등의 방법²⁶을 이용하였다. 간의 cytosol에서 GR 활성도는 Carlberg와 Mannervick 등의 방법²⁷으로 측정하였다.

단백질 정량은 bovine serum albumin 표준 단백질을 용액을 사용하여 Lowry 등의 방법²⁸을 이용한 protein assay kit (Sigma, U.S.A)를 사용하여 비색법에 의해 UV-visible spectrophotometer (HP 8453, Hewlett Packard, U.S.A)로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 통계처리

실험의 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 계산하였고 ANOVA test 후에 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.^{29,30}

결과 및 고찰

1. 혈당 변화

Streptozotocin을 투여한지 3일 후와 2주 후에 측정된 혈당량은 Table 2에 나타내었다.

비당뇨 대조군은 실험기간 내내 정상 혈당 수준을 보였으나 당뇨군은 당뇨유도 3일 후 비당뇨 대조군에 비해 유의적으로 혈당량이 높아져 모든 군에서 340 mg/dl 이상을 보였으며 실험 종료시에도 계속 높은 혈당량을 보였다.

그리고 당뇨군내에서 실험 종료시의 혈당량은 식이 내 β -carotene 첨가량에 따라 차이를 보이지 않아 β -carotene 첨가가 혈당감소에는 아무런 영향을 주지 못하였음을 알 수 있다.

Table 2. Fasting plasma glucose level during the experimental periods

Group (# of animals)	Plasma glucose (mg/dl)	
	Initial	Final
NO (9)	78.0 \pm 10.61	87.33 \pm 8.50 ^b
DO (7)	374 \pm 84.44	373.0 \pm 73.5 ^a
DL (7)	343 \pm 6.363	430.0 \pm 86.2 ^a
DM (8)	347 \pm 10.53	394.7 \pm 58.4 ^a
DH (7)	360 \pm 60.35	437.0 \pm 48.6 ^a

NO: nondiabetic · basal diet, DO: diabetic · basal diet
DL: diabetic · basal diet + 0.002% β -carotene, DM: diabetic · basal diet + 0.02% β -carotene, DH: diabetic · basal diet + 0.2% β -carotene
Values are Mean \pm SD
Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Plasma and Liver TBARS contents in experimental rats

Group (# of animals)	Plasma	Liver
	(nM/mg plasma)	(nM/mg protein)
NO (9)	0.2442 \pm 0.042 ^b	1.3620 \pm 0.124 ^{ab}
DO (7)	0.3763 \pm 0.024 ^a	1.6566 \pm 0.338 ^a
DL (7)	0.3155 \pm 0.035 ^{ab}	1.3133 \pm 0.094 ^{ab}
DM (8)	0.3215 \pm 0.037 ^{ab}	1.0300 \pm 0.125 ^b
DH (7)	0.3205 \pm 0.048 ^{ab}	1.1600 \pm 0.251 ^b

NO: nondiabetic · basal diet, DO: diabetic · basal diet
DL: diabetic · basal diet + 0.002% β -carotene, DM: diabetic · basal diet + 0.02% β -carotene, DH: diabetic · basal diet + 0.2% β -carotene
Values are mean \pm SD
Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2. 지질과산화물 함량

1) 혈장과 간의 TBARS

Table 3에서 비당뇨 대조군과 당뇨 대조군의 혈장 TBARS 함량을 비교하면 유의적으로 당뇨 대조군에서 더 높음을 볼 수 있다. 이와같이 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 쥐에서 지질과산화물이 증가됨은 Wada 등³¹과 Morel 등³²의 실험결과와 일치한다. 또한 당뇨환자에서도 혈액내 지질과산화물이 정상인에 비해 증가했다는 보고들이 있다.^{33,34} 그러나 Lee 등⁷은 당뇨유발 쥐의 혈장 TBARS 함량이 정상군에 비해 다소 높게 유지되지만 유의적인 차이는 보이지 않았다고 하였다.

당뇨군내에서는 식이 β -carotene 첨가량에 따라 혈장 TBARS 함량은 유의한 차이를 보이지 않았다. 식이내 β -carotene 첨가를 증가시킴에 따라 항산화능이 증가하여 혈장 TBARS 양도 감소할 것으로 예상하였으나 0.002% β -carotene 첨가군 (DL), 0.02% β -carotene 첨가군 (DM), 0.2% β -carotene 첨가군 (DH)의 혈장 TBARS 양은 거의 비슷하였다. 그러나 β -carotene을 전혀 보충하

지 않은 당뇨 대조군 (DO)에 비해서 β -carotene 첨가군이 유의하지는 않으나 낮은 경향이였다.

비당뇨 대조군과 당뇨 대조군의 간 TBARS 함량은 당뇨 대조군에서 높은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다. Saleh 등⁴¹⁾과 Lee 등⁷⁾의 연구에서는 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 쥐에서 간의 TBARS 함량이 증가하였다고 하였다.

당뇨군내에서 식이 β -carotene 첨가량에 따른 간 TBARS 함량을 보면 당뇨 대조군에 비해 0.002% β -carotene 첨가군 (DL)은 유의하지는 않았으나 감소되는 경향이였으며 0.02% β -carotene 첨가군 (DM)과 0.2% β -carotene 첨가군 (DH)은 당뇨 대조군에 비해서 간 TBARS 함량이 유의적인 감소를 보였다.

따라서 본 실험결과 당뇨유도로 인해 다소 증가되었던 간 TBARS 함량은 식이에 β -carotene을 보충한 결과 감소된 것으로 볼 수 있다. 또한 0.02% β -carotene 첨가군 (DM)과 0.2% β -carotene 첨가군 (DH)에서 간 TBARS 함량의 감소는 비슷하였고 0.002% β -carotene 첨가군 (DL)은 유의한 감소를 보이지 않았으므로, 본실험의 경우 0.02%와 0.2%의 β -carotene 보충이 당뇨 쥐의 간 TBARS 감소에 효과적이었던 것으로 보인다.

한편 Adel 등³⁵⁾의 실험에서도 lipopolysaccharide에 의해 뇌에 산화적스트레스가 유도된 쥐에게 21일간 β -carotene 6.68 mg/kg 체중을 매일 공급 시킨 결과 뇌의 TBARS 함량이 감소됨을 보여 β -carotene 보충이 TBARS 감소에 효과가 있음이 보고 되었다.

2) 간의 Lipofuscin과 conjugated diene

간의 Lipofuscin과 conjugated diene 함량을 측정된 결과는 Table 4와 같다.

노화, 산화적 스트레스 증가와 항산화 영양소 부족 등으로 인해 체내에 lipofuscin 색소가 축적됨은 잘 알려져있다. Lipofuscin은 mitochondria와 microsome의 지질과산화와 밀접한 관계를 가진다.²²⁾

당뇨 대조군의 간 lipofuscin 함량은 비당뇨 대조군보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 당뇨쥐의 lipofuscin 수준이 정상쥐에서보다 유의적으로 높게 나타난 Jain 등³⁶⁾의 연구결과와 당뇨 KK 마우스로 연구한 Hong³⁷⁾의 보고와 일치한다. 당뇨군에서 보이는 lipofuscin 함량의 증가는 지질과산화적 손상과 malondialdehyde가 막인지질과의 결합을 의미한다.^{36,38)}

그러나 당뇨군내에서는 식이 β -carotene 첨가량에 따른 lipofuscin 함량은 유의한 차이를 보이지 않아 β -caro-

Table 4. Liver lipofuscin and Conjugated diene contents in experimental rats

Group (# of animals)	Lipofuscin (fluorescence/10 mg protein)	Conjugated diene (O.D./mg lipid)
NO (9)	14.572 ± 6.021 ^b	1.2861 ± 0.485 ^{bc}
DO (7)	22.431 ± 0.856 ^c	1.3409 ± 0.131
DL (7)	20.564 ± 2.649 ^{bc}	1.0416 ± 0.297
DM (8)	23.953 ± 6.176 ^c	1.1361 ± 0.256
DH (7)	21.772 ± 1.581 ^{bc}	1.1180 ± 0.429

NO: nondiabetic · basal diet, DO: diabetic · basal diet

DL: diabetic · basal diet + 0.002% β -carotene, DM: diabetic · basal diet + 0.02% β -carotene, DH: diabetic · basal diet + 0.2% β -carotene

Values are Mean ± SD

Means with different subscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test.

tene이 당뇨쥐의 lipofuscin 함량 감소에는 효과를 보이지 않았음을 알 수 있다.

Conjugated diene은 불포화지방산의 과산화반응 초기에 자유 라디칼이 methylene기의 수소를 공격하여 이중결합이 이동됨으로 생성된다. 또한 이 반응은 산소분자가 없는 조건에서도 가능하여 과산화지질 형성과 직접적으로 연결된 것은 아니지만, 산소분자 존재시 지질과산화반응이 빠르게 일어나므로 conjugated diene은 지질과산화 반응의 지표로 이용된다.³⁹⁾

간의 conjugated diene의 함량은 당뇨 대조군에서 비당뇨 대조군보다 약간 증가하는 경향이였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 Lee 등⁷⁾과 Park 등⁴⁾의 연구에서는 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 쥐에서 정상쥐보다 간의 conjugated diene의 함량이 증가되었다고 하였다. 식이에 β -carotene을 첨가한 당뇨군은 당뇨 대조군에 비해 conjugated diene함량이 약간 낮은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다. 즉 conjugated diene은 lipofuscin에 비해 당뇨에 의한 함량 변화의 영향을 덜 받는 것으로 보인다.

이상의 실험결과로 보아 본 연구에서는 streptozotocin에 의한 당뇨의 유발이 혈장 TBARS와 간의 lipofuscin 등 지질과산화물 형성을 유의하게 증가시켰음을 볼 수 있었다. 또한 당뇨가 유발된 쥐의 식이에 β -carotene을 보충시켰을 때 간 TBARS의 감소 효과는 유의하게, 혈장 TBARS는 유의하지는 않으나 감소되는 경향을 나타냄을 볼 수 있었다.

따라서 당뇨로 인한 지질과산화물의 증가에 식이 β -carotene 보충이 모든 경우에 긍정적인 효과는 주지는 못하였으나 부분적으로는 지질과산화물을 감소시키는데 효과가 있었다고 사료된다.

2. 항산화효소 활성화

체내 항산화기능과 관련된 효소로는 cytosol에서 작용하는 SOD, GPx, GR, mitochondria에서 작용하는 catalase가 있으며 이들의 기능은 서로 연관되어있다.

SOD는 세포내 호흡 작용의 부산물로서 생성되는 superoxide radical을 효소 반응에 의해 제거함으로써 과산화수소의 세포내 축적을 막아주어 세포를 보호하므로⁴⁰⁾ SOD활성의 증가는 세포내 항산화능의 증가를 의미한다.

Table 5에서 보듯이 당뇨 대조군은 비당뇨 대조군에 비해 유의적으로 SOD 활성이 낮게 나타났다. 또한 당뇨쥐에게 식이 β -carotene을 보충시켜 본 결과 당뇨 대조군과 비교시 0.002% β -carotene 첨가군 (DL)은 유의적인 차이가 없었으나 0.02% β -carotene 첨가군 (DM)과 0.2% β -carotene 첨가군 (DH)에서는 SOD의 활성이 유의적으로 높게 나타났다.

Saleh⁴¹⁾ 등은 streptozocin으로 당뇨를 유발해 12시간 지속시킨후 SOD 활성이 감소됨을 보고 하여, 당뇨에 의한 SOD 활성 감소가 본 연구의 결과와 같게 나타났다. Yu 등⁴²⁾과 Bruno 등⁴³⁾도 당뇨환자는 정상인에 비해 적혈구 SOD 활성이 낮음을 보고 하여 당뇨에 의해 SOD 활성이 낮아짐을 뒷받침하고 있다.

Suh 등⁴⁴⁾은 3주간 β -carotene을 섭취한 쥐에게 streptozotocin으로 당뇨를 유도하고 1주간 β -carotene (7.2 mg/kg체중)을 보충한 결과 간의 SOD 활성이 유의하게 증가됨을 보고 하였다. 본 연구에서는 이들과 달리 당뇨 유발 전에는 β -carotene 보충을 하지 않고 당뇨 유발 후에만 보충하였으나 같은 결과를 보이고 있다.

Mekinova 등⁴⁵⁾의 실험에서도 당뇨를 유도한 쥐에게 β -carotene과 함께 Vit E, Vit C를 포함한 supplement를 섭취시킨 결과 신장의 SOD의 활성이 유의적으로 증가됨을 볼 수 있었다.

Catalase는 O₂의 환원으로 생성되거나 SOD의 작용으로 superoxide anion이 환원되어 생성된 hydrogen peroxide를 환원시켜 H₂O로 전환시키는 작용을 한다.²⁾

당뇨 대조군은 비당뇨 대조군에 비해 catalase 활성이 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었으며, 당뇨군 내에서는 식이에 β -carotene을 보충한 경우 평균 catalase 활성이 높아지는 경향을 볼 수 있었으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

Suh 등⁴⁴⁾은 3주간 β -carotene을 섭취한 쥐에게 streptozotocin으로 당뇨를 유도하고 1주간 β -carotene (7.2 mg/kg 체중)을 보충한 결과 간의 catalase 활성이 유의하게 낮아짐을 보고하여 본 연구 결과와 차이를 보이고 있으나, Mekinova 등⁴⁵⁾의 연구에서는 당뇨를 유도한 쥐에게 β -carotene, Vit E, Vit C를 포함한 supplement를 섭취시킨 결과 신장의 catalase의 활성의 변화는 없었다고 하였다.

GPx는 microsome에서 생성된 H₂O₂ 등의 과산화물 해독 기능에 catalase보다 더 효과적으로 작용하며 과산화수소, 유기과산화물 등을 기질로 사용하는 Se-의존성과 유기과산화물에만 작용하는 Se-비의존성의 2종류가 알려져 있다.⁴⁶⁾ 당뇨 대조군은 비당뇨 대조군보다 평균 GPx 활성도가 낮은 경향이던 통계적으로 유의적인 차이는 볼 수 없었으며, 당뇨군내에서 β -carotene 첨가에 따라 활성이 높아지는 경향은 있었으나 유의한 차이는 없었다. Yishai 등⁴⁷⁾은 당뇨환자에게 β -carotene을 공급하였을 때 적혈구 GPx 활성이 증가되었다고 하였으나 Mekinova⁴⁵⁾는 당뇨가 유도된 쥐에서 β -carotene의 보충은 GPx 활성을 감소시켰다고 보고하고 있어 상반된 결과를 보인다.

GR는 비당뇨 대조군과 당뇨 대조군, 또한 식이에 β -carotene을 첨가했던 모든 군에 있어서 활성도에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 5. Liver antioxidative enzyme activities in experimental rats

Group (# of animals)	SOD (U/mg protein)	Catalase (μ moles H ₂ O ₂ decomposed/min/mg protein)	GPx (nmoles NADPH oxidized/min/mg protein)	GR (nmoles NADPH oxidized/min/mg protein)
NO (9)	6.1796 \pm 0.762 ^a	75.688 \pm 6.881 ^{ns}	318.65 \pm 203.8 ^{ns}	25.460 \pm 4.355 ^{ns}
DO (7)	2.1808 \pm 0.912 ^b	44.725 \pm 24.33	143.41 \pm 1.144	23.623 \pm 5.568
DL (7)	3.7147 \pm 2.160 ^{ab}	130.73 \pm 145.9	93.049 \pm 3.191	26.707 \pm 20.28
DM (8)	6.2442 \pm 1.547 ^a	154.82 \pm 53.52	245.09 \pm 113.7	24.830 \pm 10.58
DH (7)	5.8168 \pm 1.831 ^a	134.58 \pm 33.47	312.77 \pm 62.83	26.157 \pm 11.73
NO (9)	6.1796 \pm 0.762 ^a	75.688 \pm 6.881 ^{ns}	318.65 \pm 203.8 ^{ns}	25.460 \pm 4.355 ^{ns}
DO (7)	2.1808 \pm 0.912 ^b	44.725 \pm 24.33	143.41 \pm 1.144	23.623 \pm 5.568

NO: nondiabetic · basal diet, DO: diabetic · basal diet, DL: diabetic · basal diet + 0.002% β -carotene, DM: diabetic · basal diet + 0.02% β -carotene, DH: diabetic · basal diet + 0.2% β -carotene

Values are Mean \pm SD

Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

이상의 결과로 보아 당뇨 쥐에서는 체내 항산화 방어체계에 관여하는 효소중 SOD만 유의하게 감소되었으며, 당뇨유발 후 β -carotene을 보충 섭취시켰을 때에도 SOD만이 유의한 증가를 보였다. Catalase와 GPx는 유의한 차이는 없었으나 당뇨 유발 후 활성이 감소되는 경향이었고 β -carotene을 보충시킨 경우에는 유의적인 차이는 없었으나 활성이 증가하는 경향이였다. 그러나 GR의 활성은 당뇨유발이나 β -carotene 보충에 따라 거의 변화를 보이지 않았다.

β -carotene은 강력한 free radical scavenger로서 체내에서 과산화기와 반응함으로써 과산화기가 불포화지방산과 반응하여 지질과산화물을 생성하는 것을 방지할 것으로 생각되며, 생체내 산화적 스트레스의 정도는 지질과산화물 수준이 낮을수록 항산화 효소의 활성이 높을수록 낮아진다고 생각된다. 따라서 본 연구에서 측정된 지표중 일부 지질과산화물의 수준과 항산화효소 활성도가 β -carotene 첨가에 따라 유의적인 변화를 보였으므로 β -carotene이 부분적으로 당뇨쥐의 산화적 스트레스 감소에 효과를 준 것이라고 생각된다.

요약 및 결론

본 논문은 항산화 영양소로 알려진 β -carotene을 첨가한 식이가 당뇨 쥐의 산화적 스트레스 지표인 지질과산화물 함량과 항산화효소 활성에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

실험동물로는 Sprague-Dawley계 수컷 쥐 50마리 (7주령)를 비당뇨군과 당뇨군으로 나누어 이중 당뇨군에는 streptozotocin을 복강 주사하여 당뇨를 유도하였다. 실험식은 β -carotene의 양에 따라 4군으로 나누어 기본식에 0%, 0.002%, 0.02%, 0.2%의 β -carotene을 첨가하여 공급하였다.

당뇨유도 후 실험식이를 2주간 공급한 다음 쥐를 희생시켜 쥐의 간과 혈장에서 지질과산화물인 TBARS 함량을, 간에서 lipofuscin과 conjugated diene 함량을 측정하였다. 또한 간에서 항산화효소인 SOD, catalase, GPx, GR의 활성도를 측정하였다

본 연구를 통하여 나타난 결과를 요약하면 다음과 같다. 당뇨군은 비당뇨 대조군에 비해 전 실험기간 동안 혈당이 유의적으로 높았다.

혈장 TBARS 함량은 비당뇨 대조군에 비해 당뇨 대조군에서 유의적으로 높았으나 당뇨군내에서는 식이 β -carotene 첨가량에 따른 혈장 TBARS 함량은 유의한 차이를

보이지 않았다.

간 TBARS 함량은 당뇨 대조군이 비당뇨 대조군보다 높은 경향이였으나 유의한 차이는 없었고 당뇨군내에서는 식이 β -carotene을 0.02% 이상 보충한 결과 간 TBARS 함량이 유의적으로 감소되었다.

간 Lipofuscin 함량은 비당뇨 대조군에 비해 당뇨 대조군에서 유의적으로 높았으나 당뇨군내에서는 식이 β -carotene 첨가에 따른 유의적인 차이는 없었다

간 Conjugated diene 함량은 비당뇨 대조군과 당뇨 대조군간에 유의적인 차이가 없었고 또한 당뇨군내에서도 식이 β -carotene 첨가량에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

항산화효소 중 간 SOD 활성도는 비당뇨 대조군에 비해 당뇨 대조군이 유의적으로 낮았으며 당뇨군내에서는 식이에 β -carotene을 0.02%이상 첨가한 군들에서 SOD 활성이 증가됨을 볼 수 있었다.

간 Catalase 활성도는 당뇨 대조군과 비당뇨 대조군 사이에 유의한 차이는 볼 수 없었고 당뇨군내에서는 식이 β -carotene 첨가에 따라 catalase 활성이 높아지는 경향이였으나 유의적인 차이는 볼 수 없었다.

간 GPx 활성도는 유의한 차이는 없었으나 당뇨 대조군이 비당뇨 대조군보다 낮은 경향이였고 당뇨군내에서는 식이 β -carotene 첨가에 따라 GPx 활성이 유의하지는 않았으나 높아지는 경향은 볼 수 있었다.

간 GR 활성도는 당뇨 대조군이나 비당뇨 대조군 간에 유의한 차이가 없었고 또한 당뇨군내에서 식이 β -carotene 첨가한 군간에도 유의한 차이를 볼 수 없었다.

이상의 결과로 보아 당뇨쥐에서 β -carotene의 섭취를 증가시키면 당뇨병으로 인한 과산화물 증가와 항산화효소 활성 감소를 부분적으로 완화시켜 당뇨합병증을 지연시키는 데 영향을 줄 것으로 사료된다.

그러나 당뇨병에서 β -carotene의 역할에 대한 연구는 많이 되어 있지 않으므로 보다 장기적이고 체계적인 연구가 필요하리라 본다.

Literature cited

- 1) Chang YK, Lee BK, Kim MR, Hwang GH. Clinical Nutrition *Hyoil Munwha Sa*, 1999
- 2) Kim KH. Effect of aminoguanidine treatment on the lipid peroxidation and antioxidative enzymes in liver and pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Master's Thesis, Seoul National University*, 1996
- 3) Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412, 1991

- 4) Park HS, Jang YJ, Choi DS, Namgung MA, Lee YJ, Kang SA. Increased Oxidative Stress in Sciatic Nerves of Streptozotocin-Induced Diabetic Rat: Lack of Vitamin C Effect. *Diabetes* 19(3): 279-286, 1995
- 5) Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus. *Free Radical Biology and Medicine* 10:339-352, 1988
- 6) Lawrence JC, Jill SG, Eric PD, Joyce AD, Donald DL, Mark AY. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes* 50(8): 1927-1937, 2001
- 7) Lee SZ, Park SH, Lee HS. Changes in In vivo Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense System in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: a Time Course Study. *Kor J Nutr* 34(3): 253-264, 2001
- 8) Ha AW, Noh HL, Chung YS, Lee KW, Kim HM, Cho JS. The Oxidative stress and the Antioxidant system in Type 2 Diabetics with complications. *Diabetes* 22(3): 253-261, 1998
- 9) Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK. Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rat. *Diabetologia* 36: 299-304, 1993
- 10) Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes* 41: 167-173, 1992
- 11) Bertram JS. Mechanism of action of β -carotene as a preventive agent in human health In β -carotene and human health. Korea vitamin information center, 1994
- 12) Nedyalka VY, Kurt A, Violeta GR. β -Carotene and lipid oxidation. *Fett/Lipid* 100(10): 444-462, 1998
- 13) Liebler DC. Antioxidant reactions of carotenoids In carotenoids in human health, annals of the new york academy of sciences vol 691: 20-31, 1993
- 14) Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr* 119: 109-111, 1989
- 15) Chung JY. Assessment and analysis of related factors to β -carotene Nutritional status in Diabetics and controls. *Master's Thesis, Seoul National University*, 1996
- 16) Liu S, Ajani U, Chae C, Hennekens C, Buring JE, Manson JE. Long-term β -carotene supplementation and risk of type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *JAMA* 282(11): 1073-1075, 1999
- 17) Ahn MS. Food and Principles of Food preparation, p72. *Shingwang pub. Co*, 1977
- 18) Placer ZA, Cushman LL, Johmsom BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry* 16: 359-364, 1966
- 19) Dousset JC, Trouilh M, Foglietti MJ. Plasma malonaldehyde levels during myocardial infraction. *Clinica Chimica Acta* 129: 319-322, 1983
- 20) Cho EJ. A study on lipid peroxides and glycosylated serum proteins in KK mice fed vitamin E supplemented diet. *Master's Thesis, Seoul National University*, 1994
- 21) Choi YJ, Chyun JH. Effect of Dietary Zinc deficiency and age on lipid peroxides and Zinc levels in rat blood and liver. *Kor J Nutr* 33(5): 517-523, 2000
- 22) Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Analytical Biochemistry* 52: 1-9, 1973
- 23) Reddy K, Fletcher B, Tappel AL. Measurement and spectral characteristics of fluorescent pigments in tissues of rats as a function of dietary polyunsaturated fats and vitamin E. *J Nutr* 103: 908-915, 1973
- 24) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972
- 25) Aebi H. Catalase in vitro. *Method in Enzymology* 105: 121-126, 1984
- 26) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth Enzymol* 52: 506-513, 1970
- 27) Carlberg I, Mannervick B. Glutathione reductase in methods in enzymology 113: 484-499, 1985
- 28) Gary L, Peterson. Review of the Folin Phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100: 201-220, 1979
- 29) Cho IH, SAS. *Sungahn Dang*, 1998
- 30) Choi BS, PC-SAS. *Bakyoung Sa*, 1994
- 31) Wada K, Miki H, Etoh M, Okuda F, Kusukawa R. The inhibitory effect of lipid peroxides on the activity of the membrane bound and the solubilized lipoprotein lipase. *Jan Clin J* 47: 837-842, 1983
- 32) Morel DW, Chisolm GM. Antioxidative treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 30: 1827-1834, 1989
- 33) Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. Pharmacological doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetes patients. *Am J Clin Nutr* 57: 650-656, 1993
- 34) Kang NE, Kim WK. Effect of antioxidant Vitamins supplementation on Antioxidative status and plasma lipid profiles in Korean NIDDM patients. *Kor J Nutr* 32(7): 775-780, 1999
- 35) Adel A, Kheir-Eldin, Tarek KM, Mohamed ZG. Protective effect of vitamin E, β -carotene and N-acetylcysteine from the brain oxidative stress induced in rats by lipopolysaccharide. *IJBCB* 33: 475-482, 2001
- 36) Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased Lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes* 40: 1241-1244, 1991
- 37) Hong MK. Effects of vitamin E supplementation on lipid peroxidation and glutathione-related antioxidative enzyme in liver and kidney of diabetic KK mice. *Master's Thesis, Seoul National University*, 1995
- 38) Tappel AL. Biological antioxidant protection against lipid peroxidation damage. *Am J Clin Nutr* 23: 1137-1139, 1970
- 39) Ching K. Chow. Nutritional influence on cellular antioxidant defense system. *Am J Clin Nutr* 32: 1066-1081, 1980
- 40) Halliwell B, Gutteridge MC. Free radicals in biology and medicine. *Oxford university Press, Oxford*, pp.166-170, 1985
- 41) Saleh AW, David VG. Alteration in free radical tissue defense mechanism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 36: 1014-1018, 1987
- 42) Yu BJ, Bae HY, Lee BR. The activity od erythrocyte antioxidant enzymes in Diabetes Mellitus. *Kor J Int Med* 44(6): 766-

- 774, 1993
- 43) Bruno H, Stefan LM, Gosta H. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin dependent diabetic children. *Acta Endocrinologica* 102: 235-239, 1983
 - 44) Suh MH, Yang KM, Chang JH, Suh JS. Effect of β -carotene intake on lipid and antioxidative system in diabetic rats. Abstract in fall symposium, p122, *The Soc of K. Community Nutrition*, 2001
 - 45) Mekinova D, Chorvathova V, Volkovova K, Staruchova M, Grancicova E, Klvanova J, Ondreicka R. Effect of intake of exogenous vitamins C, E, β -carotene on the antioxidative status in kidneys of rats streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung* 39(4) : 257-261, 1995
 - 46) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical research communications* 71(4) : 952-958, 1976
 - 47) Yishai L, Haya Z, Ami BA, Yoram K, Michael A. β -Carotene affects antioxidant status in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pathophysiology* 6: 157-161, 1999