

# 당뇨 동물모델에서의 기능성 쌀의 효과 측정

한혜경\* · 최성숙\* · 신진철\*\* · 정하숙\*†

\*덕성여자대학교, \*\*농촌진흥청

## I. 서 언

당뇨병은 내분비계 호르몬인 인슐린의 분비이상으로 혈중 포도당이 에너지원으로 이용되지 못하고 그 농도가 정상치를 넘어 소변으로 배설되는 증상으로 체내 당질 대사, 단백질 대사 및 지질 대사 이상을 초래한다. Streptozotocin(STZ)과 alloxan은 인슐린을 분비하는 췌장의  $\beta$ -세포를 선택적으로 파괴하여 당뇨병을 유발시키는 약물로 STZ을 동물에게 다량 투여하는 경우, 투여 후 1-2일에 당뇨병이 발생되나, 소량 투여시 1-2주일이 경과한 후에 당뇨병이 발생하기 때문에 제 1형 당뇨병 연구를 위한 동물모델 뿐 아니라 제 2형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 분비 이상과도 유사성을 보인다.

STZ 투여로 당뇨가 유발된 동물은 췌장내  $\beta$ -세포의 파괴로 인해 인슐린 생성이 감소하여 그 작용이 저하되므로 당 대사에 의한 에너지 생산부족을 초래하고 간 조직에서 아미노산이 글리코겐으로 전환되어 당이 부족한 조직으로 운반된다.

당뇨로 인한 인슐린 결핍으로 당질 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 간 조직의 당질 대사와 관련된 글리코겐 함량을 살펴볼 수 있다. 간 조직의 글리코겐 대사과정을 살펴보면, 합성 기전과 분해 기전이 서로 상호변환되고 있으며, 정상적인 상태에서는 고혈당시 포도당 분해가 촉진되므로 혈당치가 감소되나, STZ 투여를 통해 췌장  $\beta$ -세포 파괴로 인슐린이 부족한 당뇨 동물모델의 경우에는 글리코겐 합성능이 저하되어 글리코겐 함량이 감소하게 된다.

## II. 분석방법

### 1. 장치 및 기구

- 1) Water bath
- 2) Refrigerator
- 3) Centrifuge
- 4) Animal Laboratory
- 5) Vortex mixer
- 6) Vis/UV spectrophotometer

†Corresponding author: (Phone) +82-2-901-8593 (E-mail) hasook@duksung.ac.kr

## 2. 시료

농촌진흥청 작물과학관으로부터 수령한 오봉벼(*Oryza sativa* cv. *Obongbyeo*)를 외피만 취하여 80°C water bath에서 3시간 동안 ethanol로 추출한 후, 여과, 농축하여 시료 농축물을 1.0 g/kg의 농도로 14일간 경구투여한다.

## 3. 당뇨유발

### 1) Citrate buffer 제조

- (1) Citric acid( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , M.W. 210.14) 2.1014 g을 100 ml의 volumetric flask에 넣고 증류수로 녹인다. Sodium citrate( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ , M.W. 294.11) 2.9411 g을 100 ml의 volumetric flask에 넣고 증류수로 녹인다.
- (2) (1)에서 만들어 놓은 citric acid 용액 22 ml와 sodium citrate 용액 28 ml를 100 ml volumetric flask에 넣고 다시 증류수로 눈금선까지 맞춘다.
- (3) (2)의 용액을 비이커에 담고 (1)의 citric acid 용액과 sodium citrate 용액을 사용하여 pH 4.5로 맞춘 후 냉장고에 차게 보관한다.

### 2) 당뇨 유발

- (1) 실험실 환경( $22 \pm 2^\circ C$ )에 적응시킨 220 g 내외(7주령)의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 당뇨를 유발시키기 전 16시간 동안 절식시키고, 물만 공급한 후 실험 바로 전에 체중을 측정한다.
- (2) Streptozotocin(STZ) 45 mg을 냉장시킨 citrate buffer 2 ml에 녹인다. 이 용액은 얼음에 차갑게 담가 놓는다(이 용량은 흰쥐 체중 1 kg에 투여되는 분량이므로, 쥐의 체중에 따라 계산해서 녹인다. 또한 실험할 때마다 신선하게 제조하여 사용한다).
- (3) 용해시킨 STZ을 1 ml 주사기에 쥐의 체중 100 g당 0.2 ml를 주사할 수 있게 채워놓는다. 이때 주사바늘에 공기가 들어가지 않도록 한다.
- (4) 쥐를 injection holder에 넣고 70% 알코올에 적신 솜으로 꼬리를 닦아준 다음 꼬리 정



Fig. 1. Injection of streptozotocin on tail vein of experimental rats

맥에 STZ을 투여한다(Fig. 1).

- (5) STZ을 꼬리정맥에 투여한 후 24시간후에 흰쥐의 안구 정맥총에서 모세관을 이용하여 채혈한다.
- (6) 채혈한 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리시킨 후, 혈장을 취해 쥐의 혈당을 측정한다.
- (7) 비공복시 혈당치가 300 mg/dl 이상인 흰쥐를 당뇨가 유발된 것으로 간주한다.

#### 4. 글리코겐 함량분석

##### 1) 시약

- (1) 30% KOH
- (2) 95% ethanol
- (3) Anthrone solution(0.2%): 빛에 민감하므로 빛이 차단된 상태에서 만들어야 한다. 0.4g 의 anthrone을 200 ml의 volumetric flask에 넣고 진한 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 넣어 녹인다(매우 불안정하므로 사용할 때마다 신선하게 제조하여 사용한다).
- (4) Glucose standard solution
  - ① 포도당 0.2 g을 100 ml volumetric flask에 넣고 이차 증류수로 녹인다(stock solution).
  - ② Stock solution buffer 2 ml를 100 ml volumetric flask에 넣고 이차 증류수로 채운다(이것은 40 µg/ml에 해당하는 농도가 된다)
  - ③ Standard 용액을 만든다.
    - a. Std. IV (40 µg/ml) : “②”의 용액을 이용한다.
    - b. Std. III (20 µg/ml) : a 용액 50 ml와 이차 증류수 50 ml를 혼합한다.
    - c. Std. II (10 µg/ml) : b 용액 50 ml와 이차 증류수 50 ml를 혼합한다.
    - d. Std. I (5 µg/ml) : c 용액 50 ml와 이차 증류수 50 ml를 혼합한다.

##### 2) 방법

- (1) Tube(유리시험관, 15 ml 정도로 원심분리에 들어갈 수 있는 것)를 준비한다.
- (2) 쥐의 간 0.2 g을 측정해서 tube에 넣는다.
- (3) 30% KOH 1 ml를 각 sample에 더하고 marbles로 뚜껑을 한다.
- (4) 100°C의 water bath에서 20분간 끓인 후 꺼내서 얼음으로 식힌다.
- (5) 식으면 ethanol(95%) 1.25 ml를 더하여 vortex하고 다시 marbles로 뚜껑을 한다.
- (6) 5분간 다시 100°C water bath에서 끓이고 얼음물로 식힌다.
- (7) 3,000 rpm(4°C)에서 15분간 원심분리한 후 상층액(upper layer)을 조심스레 따라 버리고, 남은 ethanol은 water bath에서 몇 분간 끓여서 증발시킨다.
- (8) 각 tube에 이차 증류수 5 ml를 넣어 침전물을 녹인다.
- (9) (8)액 0.5 ml를 취하여 이차 증류수 4.5 ml를 넣고 vortex한다.
- (10) (9)액 1 ml를 취하여 anthrone 용액 2 ml를 넣고 vortex한다.

- (11) Blank로 이차 증류수 1 ml, standard I, II, III, IV 1 ml도 같이 실시한다.
- (12) (10)과 (11)의 tube들을 10분간 water bath에서 끓인 후 얼음물에 식힌다.
- (13) Vis/UV spectrophotometer로 620 nm에서 흡광도를 측정한다.
- (14) 측정된 값이 standard curve안의 수치가 나오지 않으면 다시 희석한 후 (10)번부터 (13)번까지를 다시 반복 실험한다.

3) 계산식 : 측정된 농도에 희석배수 277.5를 곱해준다

$$(5/0.2 \times 10 \times 1.11 = 277.5)$$

→ correction factor for glucose  $\rightleftharpoons$  glycogen

### III. 결과

#### 1. 정상 및 당뇨 모델 흰쥐의 혈중 포도당 함량

STZ으로 당뇨가 유발된 동물모델(DC)의 혈당치는 실험 2주간 490-610 mg/dl의 혈당치를 나타냈으며, 시료(*Oryza sativa cv. Obongbyeo*)를 투여한 동물모델(D-OB)의 경우, 전체적으로 혈당강하가 일어났으며, 실험기간이 6일 이후부터 혈당치가 급격하게 감소함을 확인하였다(Fig. 2).

#### 2. 정상 및 당뇨 모델 흰쥐의 간 조직 글리코겐 함량

정상 모델 흰쥐 (NC)의 간조직 글리코겐 함량(52 mg/g)이 당뇨 모델(DC)에서는 7.4 mg/g으로 급격히 감소됨을 확인하였다. 이어서 당뇨 모델흰쥐에 시료(*Oryza sativa cv. Obongbyeo*)를 14일간 투여한 당뇨실험군(D-OB)의 경우, 간 글리코겐 농도가 약간 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

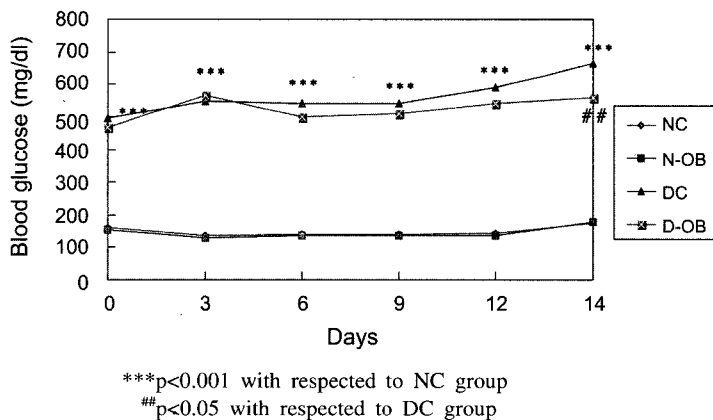


Fig. 2. Plasma glucose level of normal and diabetic rats fed *Oryza sativa cv. Obongbyeo*.

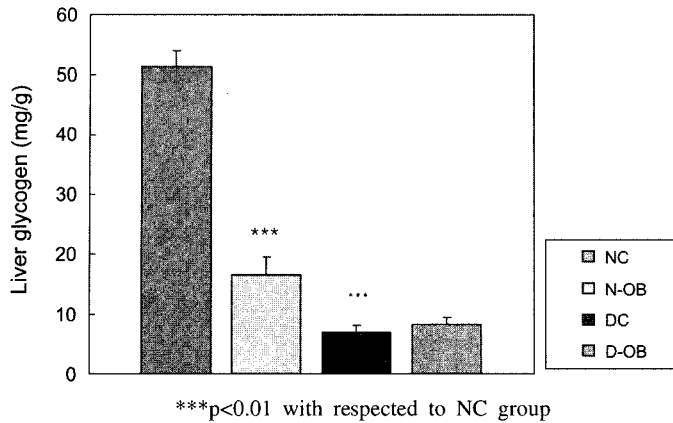


Fig. 3. Liver glycogen level of normal and diabetic rats fed *Oryza sativa* cv. *Obongbyeo*.

### 참고문헌

- 1 Bruce, D. G., D. J. Chishoim, L. H. Stolien, and E. W. Kragen. 1998. Physiological importance of deficiency in early prandial insulin secretion in non-insulin dependent diabetes. *Diabetes* 37 : 736-741.
2. Hassid, W. Z. and X. Abraham. 1957. In *Methods in Enzymology* 3, Chemical procedures for analysis of polysaccharides. Academic press. pp. 34-50.
3. Joo, C. N. and J. H. Kim. 1992. Study on the hypoglycemic action of ginseng saponin on streptozotocin induced diabetic rats (I). *Kor. Ginseng* 16(3) : 190-197.
4. Lee, H. C. 1998. Insulin secretion in NIDDM. *Korea Diabetes Assoc.* 12(2) : 113-117.
5. Like, A. and A. A. Rossini. 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis. A new model of diabetes mellitus. *Science* 193 : 15-21.
6. Rossini, A. A. 1978. Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Nature* 276 : 182-184.
7. Saudek, C. D. and H. A. Eder. 1979. Lipid metabolism in diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 66 : 843-849.
8. Chung, H. S. and H. K. Han. 2003. Effects of the fraction of *Oryza sativa* cv. *Heugjinmi* on plasma glucose and lipid levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34(1) : 103-108.

## *Determination of Biological Effect of Obongbyeo in Experimental Diabetic Rats*

*Hye Kyoung Han\**, *Sung Sook Choi\**, *Jin Chul Shin\*\**  
and *Ha Sook Chung\*†*

\*Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

\*\*National Institute of Crop Science, R.D.A., Suwon 441-857, Korea  
+82-2-901-8593, hasook@duksung.ac.kr