

Genistein과 Daidzein 급여가 제2형 당뇨병동물모델의 적혈구와 조직 중의 항산화방어계에 미치는 영향

박선애¹, 김명주², 장주연², 최명숙³, 여지영³, 이미경^{4†}

¹영남대학교 식품영양학과, ²대구산업정보대학 식품영양과
³경북대학교 식품영양학과, ⁴순천대학교 식품과학부

Effect of Genistein and Daidzein on Antioxidant Defense System in C57BL/KsJ-*db/db* Mice

Sun Ae Park¹, Myung-Joo Kim², Joo-Yeun Jang², MyungSook Choi³,
Jiyoung Yeo³ and Mi-Kyung Lee^{4†}

¹Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Daegu Polytechnic College, Daegu 706-022, Korea

³Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

⁴Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Jeonnam 540-742, Korea

Abstract

Our preliminary study showed that genistein and daidzein improved blood glucose level in type 2 diabetic mice by enhancing the glucose and lipid metabolism. The objective of this study was to evaluate whether genistein and daidzein are associated with alterations in antioxidant defense mechanism of type 2 diabetic mice. Male C57BL/KsJ-*db/db* (*db/db*) mice and age-matched non-diabetic littermates (*db/+*) were used in this study. The *db/db* mice were divided into control, genistein (0.02%, w/w) and daidzein (0.02%, w/w) groups. The relative weights of liver, epididymal adipose tissue and perirenal adipose tissue were significantly higher in the *db/db* group than in the *db/+* group, whereas heart weight was lower. The genistein and daidzein supplement did not affect the organ weights in *db/db* mice. The blood glucose level was positively correlated with superoxide dismutase (SOD, $r=0.380$, $p<0.05$) and catalase (CAT, $r=0.345$, $p<0.05$) activities and negatively correlated with glutathione peroxidase (GSH-Px, $r=-0.404$, $p<0.05$) activity in erythrocyte. Therefore, the erythrocyte SOD and CAT activities were significantly elevated in the *db/db* group compared to the *db/+* group and the GSH-Px activity was lowered. However, the supplementation of genistein and daidzein reversed erythrocyte CAT and GSH-Px activities in type 2 diabetic mice. In this current study, the SOD activities in liver, kidney and heart were significantly not different between the groups. The CAT and GSH-Px activities in liver and GSH-Px activity in kidney were significantly higher in the *db/db* group than in the *db/+* group, while the CAT activity in kidney, CAT and GSH-Px activities in heart were lowered. The supplementation of genistein and daidzein significantly attenuated the changes of CAT and/or GSH-Px activities in liver and heart. The supplementation of genistein and daidzein elevated GSH levels in kidney and heart compared to the *db/db* control group. The lipid peroxide levels in liver, kidney and heart were significantly lowered in the genistein and daidzein supplemented groups compared to the *db/db* control group. These results suggest that genistein and daidzein might be beneficial for the prevention of type 2 diabetic complication via suppressing changes of antioxidant enzymes activities with simultaneous reduction of lipid peroxidation.

Key words: genistein, daidzein, antioxidant enzymes, type 2 diabetes

서 론

옛부터 한국인의 식생활에 큰 비중을 차지해 온 대두와 대두가공식품에는 단백질과 지방이 각각 40%, 20% 함유되어 있어 쌀이 주식인 한국인의 영양균형을 유지해 주는 중요한 식품이 되어왔다(1). 대두 단백질의 혈장지질과 지단백질

함량 저하효과로 만성퇴행성 질환예방을 위한 연구가 시행되고 있다(2,3). 미국 FDA는 콩단백 6.25 g 섭취시 혈중 LDL-콜레스테롤 농도가 10%정도 낮아지므로 콩단백의 심장병 발병률 감소를 인정하였으며 대두단백질 제품이 포화지방, 콜레스테롤, 나트륨 함량이 낮은 것에 대하여 Health Claim을 부여하였다(4). 또한 대두의 이소플라본, 사포닌, 레

†Corresponding author. E-mail: leemk@sunchon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3656, Fax: 82-61-750-3650

시틴, 올리고당 등을 기능성식품 소재로 하는 연구도 활발히 진행되고 있다(5).

대두 중의 이소플라본은 17β -estradiol과 유사한 화학구조로 여성호르몬 유사작용이 있어 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)이라 불린다(6). 이소플라본의 주요성분인 genistein과 daidzein은 대부분 배당체 형태인 genistin과 daidzin으로 존재하며, 섭취 후 당이 제거된 aglycone 형태로 흡수되거나 장내 미생물에 의해 분해된다(7). 대두 이소플라본이 혈 중 콜레스테롤 농도를 낮추고 폐경기 여성의 골격 손실을 억제하여 심혈관질환, 골다공증을 예방할 뿐만 아니라 폐경기 이후의 각종 증후군을 완화하고 항암효과 등 생리활성에 대한 연구결과가 보고되어 있다(8). 제2형 당뇨병환자에게 이소플라본(>165 mg)과 섬유소(20 g/day)가 함유되어 있는 대두단백질(50 g/day)이 LDL-콜레스테롤, 아포지단백 B-100 및 중성지방은 낮추었으나 당대사와 당화헤모글로빈 함량에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있다(3). 이와 같이 대두가 당뇨병에 미치는 영향에 대한 연구들이 진행되고 있으나 대두의 항당뇨 효과가 이소플라본에 기인하는지 다른 성분에 의한 것인지에 대한 기전연구는 밝혀져 있지 않다(9). 특히, 대두의 주요 이소플라본 성분인 genistein과 daidzein의 혈당강하 효능에 관한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구자들은 선행연구에서 식욕항진, 비만, 고혈당, 인슐린 저항성, 고렙틴혈증, 고인슐린혈증 등 제2형 당뇨병환자와 유사한 임상적 특징을 지닌(10-12) C57BL/KsJ-*db/db* 마우스에서 genistein과 daidzein이 글루카곤에 대한 인슐린의 비와 해당과정을 증가시킨 반면 당신생성 관련 효소활성 억제 및 지방산과 콜레스테롤 대사를 개선함으로써 혈당강하작용을 나타낸다고 보고하였다(13). 또한 최근 이소플라본의 항산화작용이 여러 질병을 개선시키는 요인으로 보고되고 있으므로(14) 본 연구에서는 제2형 당뇨 동물모델인 C57BL/KsJ-*db/db* 마우스에게 genistein과 daidzein을 각각 급여한 후 적혈구와 조직(간, 신장, 심장) 중의 항산화효소 활성, glutathione과 지질과산화물 함량 및 변수간의 상관관계를 분석함으로써 대두 이소플라본의 항산화작용을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육

실험동물은 5주령의 수컷 C57BL/KsJ-*db/db*(*db/db*) 마우스 30마리와 이형접합체(heterozygote) C57BL/KsJ-*db/+*(*db/+*) 마우스 10마리를 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)로부터 구입하였다. *db/+*와 *db/db* 마우스는 2주간 고형식으로 적응시킨 후 *db/+* 마우스를 비당뇨군으로 *db/db* 마우스는 당뇨실험군으로 하여 난괴법에 의해 당뇨대조군(*db/db*), genistein 급여군(*db/db*-genistein), daidzein 급여

군(*db/db*-daidzein)으로 나누어 6주간 사육하였다. 동물사육실의 환경은 항온($20\pm 2^\circ\text{C}$), 항습($50\pm 4\%$), 12시간 간격(light on 08:00~20:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고 동물들은 stainless cage에 한 마리씩 분리하여 사육하였다.

본 실험에 사용한 기본식이인 AIN-76(15)의 식이조성에 준하였으며 단백질 급원으로는 카제인(Murray, UK)을 공급하고, 탄수화물 급원은 옥수수 전분(신동방), 지방 급원으로는 옥수수기름(제일제당)을 사용하였다. 실험식은 기본食이를 기준으로 0.02% genistein(w/w, Sigma Co.)과 0.02% daidzein(w/w, Sigma Co.)을 첨가하여 조제하였다. 식이와 식수는 자유롭게 섭취(*ad libitum*)하도록 하였고, 모든 실험식은 사육기간동안 냉장보관하였다.

시료 채취

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간동안 절식시킨 후에 테르를 흡입시켜 1차 마취시키고 다시 ketamin-HCl(유한양행, 75 mg/kg body weight)을 근육주사하여 2차 마취시킨 다음 복부 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 공복혈액을 채취하였다. 실험동물의 장기조직은 혈액채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였으며 즉시 액체질소로 급냉시켜 -70°C 에 보관하였다.

적혈구 효소원 분리

적혈구는 McCord와 Fridovich의 방법(16)에 준하여 적혈구를 분리하였다. 헤파린 처리된 혈액은 $600\times g(4^\circ\text{C})$ 에서 15분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 완전히 제거한 후 0.9% 생리식염수로 3회 세척한 후 증류수로 용혈시켜 희석하여 항산화효소 측정을 위한 효소원으로 사용하였다. 이 때 superoxide dismutase(SOD) 분석용은 에탄올:클로로포름(3:5, v/v)을 상층액 부피의 2/5가 되도록 첨가하여 혼합한 후 증류수를 첨가하여 $10,000\times g(4^\circ\text{C})$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 사용하였다. 적혈구의 효소활성도는 kit(아산제약) 시약을 사용하여 측정한 헤모글로빈 g당의 고유활성도로 나타내었다.

조직 중의 효소원 분리

간조직은 4배량의 0.25 M sucrose(pH 7.4) 완충용액, 신장조직은 9배량의 0.25 M sucrose, 0.5 mM EDTA 및 5 mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)가 포함된(pH 7.4) 완충용액 그리고 심장조직은 9배량의 75 mM sucrose, 225 mM mannitol 및 0.1 mM EDTA가 포함된(pH 7.4) 완충용액을 각각 가하여 균질기(Glascol, 099C K44, USA)로 마쇄하여 얻은 균질액을 $600\times g(4^\circ\text{C})$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상층액을 얻었다. 이를 $10,000\times g(4^\circ\text{C})$ 에서 20분간 원심분리하여 미토콘드리아 분획을 취했으며, 분리된 상층액을 $100,000\times g(4^\circ\text{C})$ 에서 1시간 초원심분리하여 시토플 분획을 얻었다. 미토콘드리아 침전물은 사용된 완충용액에 각각 녹

인 후 효소원으로 사용하였다. 이 때 SOD 분석용은 에탄올:클로로포름(3:5, v/v)을 상층액 부피의 2/5가 되도록 첨가하여 혼합한 후 10,000×g(4°C)에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 사용하였다. 미토콘드리아 분획은 catalase(CAT)활성 측정에 사용하였고 시토졸 분획은 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성 측정에 사용하였다. 조직의 효소활성도는 Bradford의 방법(17)을 사용하여 측정된 단백질 mg당의 고유활성도로 나타내었다.

항산화효소 활성 및 glutathione 함량

SOD활성은 Marklund와 Marklund의 방법(18)으로 측정하였다. 효소원을 넣지 않고 반응시킨 0.5 mM pyrogallol 용액의 자동산화율 50% 억제하는 헤모글로빈 또는 단백질 양으로 각각 나타내었다. CAT 활성은 Abei의 방법(19)에 준하여 1분간 1 g의 헤모글로빈 또는 1 mg의 단백질의 의해 소실되는 과산화수소 양을 μmol 로 나타내었다. GSH-Px활성은 Paglia와 Valentine의 방법(20)에 준하여 헤모글로빈 1 g당 또는 단백질 1 mg당 1분동안 산화되는 NADPH를 각각 μmol 과 nmol로 나타내었다. Glutathione(GSH) 함량은 Ellman의 방법(21)에 따라 측정하여 헤모글로빈 1 g당 또는 단백질 1 mg 당 각각 μmol 로 나타내었다.

지질과산화물 함량

적혈구 중의 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis 등의 방법(22)을 적용하였다. 적혈구 0.5 mL에 5% trichloroacetic acid 용액 3 mL와 0.06 M thiobarbituric acid(TBA)용액 1 mL를 가하여 혼합한 다음 80°C에서 90분간 발색시키고 실온에서 냉각한 후 600×g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tetramethoxypropane의 표준검량선에 의해 지질과산화물 양을 산출하여 헤모글로빈 1 g당 생성된 말론디알데히드 nmol로 나타내었다.

조직 중의 지질과산화물 측정은 Ohkawa 등의 방법(23)에 준해 측정하였다. 조직에 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4)을 첨가하여 빙냉상태에서 균질기(Glascol, 099C K44, USA)로 균질화하였다. 균질액 0.1 mL, 8.1% sodium dodecyl sulfate 용액 0.1 mL 및 증류수 0.3 mL를 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 후 20% acetate(pH 3.5) 완충액 0.75 mL와 0.8% TBA 1.5 mL를 첨가하여 95°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 실온에서 냉각한 후 증류수 1 mL와 n-butanol:pyridine(15:1, v/v) 용액 5 mL를 첨가하여 600

×g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조직 1 g당 생성된 말론디알데히드 nmol로 나타내었다.

통계처리

실험결과는 SPSS package 프로그램을 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 표시하였고 각 군간의 평균치의 통계적 유의성 검정은 one-way ANOVA를 실시하고 다군간의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test로 사후 검정하였다. 변수 간 상관관계는 Pearson's correlation을 적용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

장기무게에 미치는 영향

실험 6주 후 체중단위당 장기무게 변화는 Table 1에 나타내었다. *db/db*군은 *db/+*군에 비해 간, 부고환지방 및 신장 주변 지방의 무게는 유의적으로 높은 반면, 신장무게는 실험군간에 차이가 없었으며 심장의 무게는 유의적으로 낮았다. 심장무게 감소는 *db/db* 마우스의 경우 10~14주령이 되던 당의 이용성이 감소될 뿐만 아니라 지방산 산화가 증가되어 심장수축이 발생하여 당뇨병성 심근증이 유발되는데(24, 25), 본 실험에서 *db/db* 마우스가 13주령임을 감안할 때 유사한 결과로 생각된다. *db/db* 마우스에서 genistein과 daidzein 급여에 따른 장기무게 변화는 관찰되지 않았다. 이는 선행연구에서 *db/db* 마우스에게 genistein과 daidzein 보충 급여가 혈장 leptin 농도뿐만 아니라 체중과 식이섭취량에 영향을 미치지 않은 것(13)과 일치된 결과로 사료된다.

적혈구 중의 항산화효소 활성에 미치는 영향

적혈구 중의 항산화효소 활성과 상관성은 Table 2와 3에 각각 나타내었다. 적혈구의 SOD와 CAT활성은 당뇨대조군(*db/db*)이 비당뇨군(*db/+*)에 비하여 각각 약 2배, 1.3배 높은 반면, GSH-Px활성은 *db/db*군이 *db/+*군에 비해 유의적으로 낮았다. 특히, 적혈구는 고농도의 산소에 노출되어 있어서 oxyhemoglobin에서 methemoglobin으로의 자동산화가 발생하며 지속적으로 산소유리기가 생성되므로 산화적 손상에 민감하고(26) 또한 고혈당으로 인해 생성된 과잉의 유리기가 당뇨 합병증의 원인 중 하나이므로(27) 산화적 스트레스를 제거하여 당뇨병을 치료하려는 시도가 행해지고 있다.

Table 1. Effects of genistein and daidzein on organ weights in C57BL/KsJ-*db/db* mice

(mg/g B.W.)

	<i>db/+</i>	<i>db/db</i>	<i>db/db</i> -genistein	<i>db/db</i> -daidzein
Liver	36.38±0.37 ^{2)a3)}	57.00±1.61 ^b	56.07±0.91 ^b	55.15±1.14 ^b
Kidney	13.75±0.15	13.99±0.62	13.83±0.38	14.09±0.10
Heart	4.82±0.13 ^a	3.47±0.09 ^b	3.41±0.09 ^b	3.71±0.16 ^b
Epididymal WAT ¹⁾	23.67±1.87 ^a	49.11±0.81 ^b	45.87±1.41 ^b	47.96±1.10 ^b
Perirenal WAT	9.10±0.08 ^a	26.65±1.40 ^b	24.32±1.26 ^b	23.38±0.95 ^b

¹⁾WAT, white adipose tissue.

²⁾Mean±SE (n=10).

³⁾Means in the same row not sharing a common letter are significantly different between groups ($p < 0.05$).

Table 2. Effects of genistein and daidzein on antioxidant enzyme activities of erythrocytes in C57BL/KsJ-*db/db* mice

	<i>db/+</i>	<i>db/db</i>	<i>db/db</i> -genistein	<i>db/db</i> -daidzein
SOD (unit/g Hb)	782.69±96.09 ^{1)a2)}	1613.08±54.25 ^b	1572.31±29.02 ^b	1038.54±53.91 ^a
CAT (μmol/min/g Hb)	57.94±2.21 ^a	73.72±3.12 ^b	57.65±1.66 ^a	67.87±3.54 ^b
GSH-Px (μmol/min/g Hb)	9.23±0.49 ^a	6.66±0.23 ^c	7.76±0.17 ^b	8.14±0.39 ^b
GSH (μmol/g Hb)	119.35±8.12 ^a	144.18±4.30 ^b	152.27±8.45 ^b	152.70±11.79 ^b

SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSH, glutathione.

¹⁾Mean±SE (n=10).

²⁾Means in the same row not sharing a common letter are significantly different between groups (p<0.05).

Table 3. Correlation coefficients among various markers related to erythrocyte antioxidant enzymes

	Blood glucose	eSOD	eCAT	eGSH-Px	eGSH
eSOD	0.380*				
eCAT	0.345*	0.255			
eGSH-Px	-0.404*	-0.226	0.115		
eGSH	0.316	0.182	0.371*	0.119	
eLPO	0.611**	0.575**	0.377*	-0.009	0.342

eSOD, erythrocyte superoxide dismutase; eCAT, erythrocyte catalase; eGSH-Px, erythrocyte glutathione peroxidase; eGSH, erythrocyte glutathione; eLPO, erythrocyte lipid peroxide. *p<0.05, **p<0.01.

본 실험에서 적혈구의 항산화효소 변화는 혈당과 유의적 상관성이 있었는데 SOD와 CAT활성은 혈당과 양의 상관성을 지닌 반면, GSH-Px활성은 음의 상관관계를 나타내었다. 세포내 SOD는 산소유리기의 세포손상에 대한 1차 방어선으로 산화과정에서 생성된 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키고 과산화물을 신속히 분해시켜 금속이온을 안정화시킨다. 제2형 당뇨병 환자는 정상인보다 적혈구의 SOD활성이 감소되어 혈장 내 지질과산화가 증가한다고 보고(28)되어 있으나 본 결과에서는 *db/db* 마우스 적혈구의 SOD활성이 *db/+* 마우스보다 유의적으로 높았다. 생체는 만성적인 산화적 스트레스에 적응하고 방어하기 위한 항산화효소 활성의 up-regulate작용이 있으므로(29) 지속적인 고혈당으로 인해 생성된 유리기를 제거하기 위해 *db/db* 마우스 적혈구의 SOD활성이 증가한 것으로 사료된다. 이 때 SOD활성에 의해 생성되는 과잉의 과산화수소는 체내 CAT와 GSH-Px활성에 의해 물로 무독화되는데 CAT활성은 과산화수소의 1차적 방어효소인 반면, GSH-Px는 제거되지 못한 과산화수소를 제거하게 된다.

적혈구의 SOD활성은 daidzein 급여군에서만 당뇨대조군에 비하여 낮았으며 genistein과 daidzein 보충으로 *db/db*군

의 상승된 CAT활성은 저하된 반면, 억제된 GSH-Px활성은 증가됨으로써 장기간의 고혈당으로 인한 적혈구의 항산화효소 변화를 완화하였다. 이는 *db/db*군의 혈당이 *db/+*군에 비하여 유의적으로 높았으나(*db/db*군: 637.72±33.84 mg/dL과 *db/+*군: 163.00±21.40 mg/dL) genistein과 daidzein의 6주간 보충급여로 각각 14.4%, 9.2% 개선되었던 결과(13)와 일치한다. 적혈구의 GSH함량은 당뇨군들이 비당뇨군에 비해 유의적으로 높았으나 genistein과 daidzein 급여에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

간조직 중의 항산화효소 활성에 미치는 영향

간조직 중의 항산화효소 활성과 상관성은 Table 4와 5에 각각 나타내었다. 간조직 중의 SOD활성은 혈당과 유의적인 상관성은 없었으며 *db/db*군이 *db/+*군에 비하여 증가하는 경향이였다. CAT와 GSH-Px활성은 *db/db*군이 *db/+*군에 비하여 유의적으로 높았으며 특히, GSH-Px활성은 혈당과의 유의적인 양의 상관성이 관찰되었다. GSH-Px활성은 과산화수소의 제거뿐만 아니라 세포막의 지질과산화물의 연쇄반응을 차단하는 것으로 알려져 있다(30). 간조직 중의 GSH-Px활성은 CAT활성과 양의 상관성을 나타냄으로써

Table 5. Correlation coefficients among various markers related to liver antioxidant enzyme

	Blood glucose	/SOD	/CAT	/GSH-Px	/GSH
/SOD	-0.095				
/CAT	0.182	0.367*			
/GSH-Px	0.503**	0.150	0.619**		
/GSH	-0.300	0.015	0.387*	0.219	
/LPO	0.118	0.165	0.149	0.155	-0.166

/SOD, liver superoxide dismutase; /CAT, liver catalase; /GSH-Px, liver glutathione peroxidase; /GSH, liver glutathione; /LPO, liver lipid peroxide.

*p<0.05, **p<0.01.

Table 4. Effects of genistein and daidzein on antioxidant enzyme activities of liver in C57BL/KsJ-*db/db* mice

	<i>db/+</i>	<i>db/db</i>	<i>db/db</i> -genistein	<i>db/db</i> -daidzein
SOD (unit/mg protein)	33.16±1.80 ^{1)ab2)}	36.79±1.18 ^b	35.02±1.06 ^{ab}	30.68±0.71 ^a
CAT (μmol/min/mg protein)	0.80±0.05 ^a	2.14±0.18 ^b	1.06±0.22 ^a	1.09±0.07 ^a
GSH-Px (nmol/min/mg protein)	8.83±0.27 ^a	11.15±0.11 ^c	10.18±0.15 ^b	10.15±0.26 ^b
GSH (nmol/g)	6.23±0.24	6.02±0.11	6.03±0.18	6.05±0.16

SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSH, glutathione.

¹⁾Mean±SE (n=10).

²⁾Means in the same row not sharing a common letter are significantly different between groups (p<0.05).

Table 6. Effects of genistein and daidzein on antioxidant enzyme activities of kidney in C57BL/KsJ-*db/db* mice

	<i>db/+</i>	<i>db/db</i>	<i>db/db</i> -genistein	<i>db/db</i> -daidzein
SOD (unit/mg protein)	2.71±0.03 ¹⁾	2.81±0.15	2.53±0.12	2.57±0.09
CAT (μmol/min/mg protein)	10.93±1.80 ^{a2)}	6.73±0.18 ^b	7.16±0.50 ^b	7.76±0.15 ^b
GSH-Px (nmol/min/mg protein)	17.72±0.38 ^a	24.78±0.62 ^a	23.16±0.66 ^{bc}	22.39±0.52 ^b
GSH (nmol/g)	0.96±0.06 ^a	0.77±0.01 ^b	0.87±0.02 ^a	0.88±0.03 ^a

SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSH, glutathione.

¹⁾Mean±SE (n=10).

²⁾Means in the same row not sharing a common letter are significantly different between groups (p<0.05).

Table 7. Correlation coefficients among various markers related to kidney antioxidant enzyme

	Blood glucose	<i>k</i> SOD	<i>k</i> CAT	<i>k</i> GSH-Px	<i>k</i> GSH
<i>k</i> SOD	-0.496**				
<i>k</i> CAT	-0.481**	0.268			
<i>k</i> GSH-Px	0.668**	-0.112	-0.288		
<i>k</i> GSH	-0.429*	0.265	0.119	-0.600**	
<i>k</i> LPO	0.093	0.387*	-0.073	0.179	-0.309

*k*SOD, kidney superoxide dismutase; *k*CAT, kidney catalase; *k*GSH-Px, kidney glutathione peroxidase; *k*GSH, kidney glutathione; *k*LPO, kidney lipid peroxide.

*p<0.05, **p<0.01.

두 효소활성 변화가 같은 양상을 나타내고 있다.

고혈당으로 인한 간조직의 SOD활성 변화는 daidzein 급여군에서만 유의적으로 개선하였으나 CAT/SOD 비를 비교해 보면 genistein과 daidzein 급여군 모두 당뇨대조군에 비하여 정상수준으로 회복되는 것을 알 수 있다. GSH-Px활성 역시 genistein과 daidzein 급여로 당뇨대조군에 비하여 유의적으로 개선되었으나 GSH함량 변화에는 영향을 미치지 않았다.

신장조직 중의 항산화효소 활성에 미치는 영향

당뇨병의 신질환 발생과정에서도 산화적 스트레스가 관여하는 것으로 보고되어 있으므로(31) 본 실험에서는 신장조직 중의 항산화효소 활성과 상관성을 분석하여 Table 6과 7에 각각 나타내었다.

당뇨병 환자의 신장 SOD활성이 증가(32)하였다는 결과와 감소하였다는 상반된 결과(33,34)들이 보고되고 있으나 본 실험에서 신장의 SOD활성은 당뇨군과 비당뇨군간의 유의적인 차이가 없었다. 혈당과의 상관성은 적혈구와 상반되는 결과로 SOD와 CAT활성은 혈당과 음의 상관관계인 반면, GSH-Px활성은 혈당과 양의 상관성을 나타내었다.

GSH-Px활성은 총 GSH함량과 유의적인 음의 상관성으로 나타냄으로써 신장조직에서 고혈당으로 인한 GSH-Px활성은 항산화물질인 총 GSH함량 감소를 동반하는 것으로 관찰되었다. 본 실험에서 고혈당 상태에서 CAT활성이 감소됨으로써 과산화수소 제거는 GSH-Px에 의해 이루어져 GSH의 소비가 증가된 것으로 사료된다. Bhatia 등(35)도 당뇨병 신질환 환자의 GSH 수준은 현저히 감소되었음을 보고하였다. 그러나 genistein과 daidzein 급여는 당뇨대조군에 비해 총 GSH 함량감소를 효과적으로 억제하였으며, 특히 daidzein 급여군의 GSH-Px활성은 당뇨대조군에 비해 유의적으로 개선되었다.

심장조직 중의 항산화효소 활성에 미치는 영향

최근 당뇨병으로 인한 심혈관질환 발병의 주원인으로 산화적 스트레스가 제기되고 있으므로(36,37) 심장조직 중의 항산화효소 활성도와 상관성을 분석하여 Table 8과 9에 각각 나타내었다. 심장조직의 SOD활성 역시 실험군간의 유의적인 변화가 관찰되지 않았으나 CAT와 GSH-Px활성은 *db/db*군이 *db/+*군에 비해 유의적으로 낮았다. 특히, GSH-Px활성은 혈당과 유의적인 음의 상관성을 나타냄으로써 본

Table 9. Correlation coefficients among various markers related to heart antioxidant enzyme

	Blood glucose	<i>h</i> SOD	<i>h</i> CAT	<i>h</i> GSH-Px	<i>h</i> GSH
<i>h</i> SOD	-0.009				
<i>h</i> CAT	0.119	0.140			
<i>h</i> GSH-Px	-0.712**	0.220	0.316		
<i>h</i> GSH	0.384*	-0.113	0.427*	-0.120	
<i>h</i> LPO	0.205	-0.102	-0.550**	-0.567**	-0.210

*h*SOD, heart superoxide dismutase; *h*CAT, heart catalase; *h*GSH-Px, heart glutathione peroxidase; *h*GSH, heart glutathione; *h*LPO, heart lipid peroxidation.

*p<0.05, **p<0.01.

Table 8. Effects of genistein and daidzein on antioxidant enzyme activities of heart in C57BL/KsJ-*db/db* mice

	<i>db/+</i>	<i>db/db</i>	<i>db/db</i> -genistein	<i>db/db</i> -daidzein
SOD (unit/mg protein)	15.08±1.06 ¹⁾	16.16±0.67	16.14±0.82	15.38±0.37
CAT (μmol/min/mg protein)	3.70±0.26 ^{b2)}	1.69±0.07 ^a	7.47±0.22 ^c	3.95±0.23 ^b
GSH-Px (nmol/min/mg protein)	8.73±0.12 ^a	6.67±0.17 ^b	7.23±0.22 ^b	7.35±0.19 ^b
GSH (nmol/g)	0.58±0.01 ^a	0.56±0.02 ^a	0.71±0.01 ^b	0.76±0.04 ^b

SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSH, glutathione.

¹⁾Mean±SE (n=10).

²⁾Means in the same row not sharing a common letter are significantly different between groups (p<0.05).

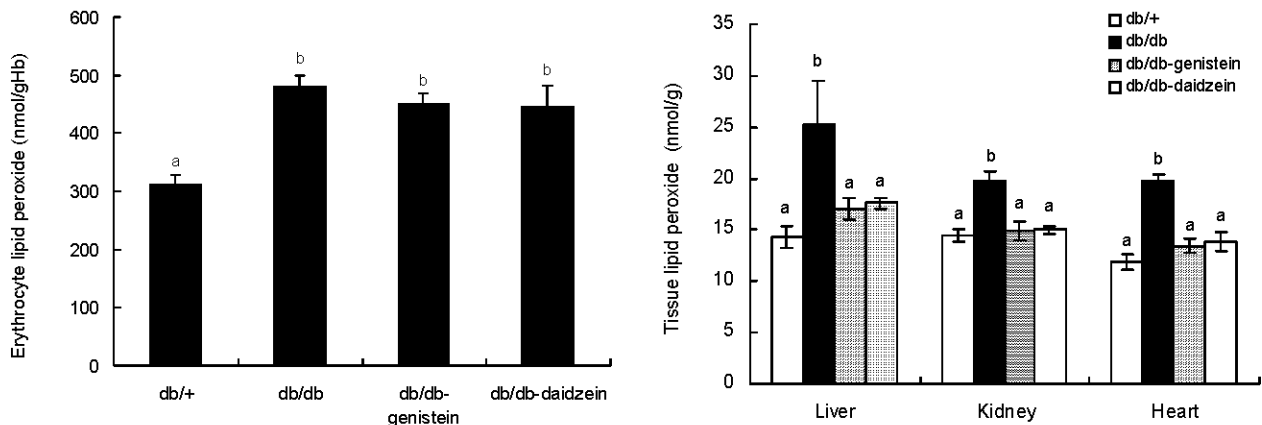


Fig. 1. Effects of genistein and daidzein on lipid peroxide levels of erythrocyte, liver, kidney and heart in C57BL/KsJ-*db/db* mice. Mean \pm SE (n=10). Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p < 0.05$).

혈당결과와 일치하는 것으로 관찰되었다. 본 실험에서 genistein과 daidzein 급여로 고혈당으로 인해 변화된 심장조직의 CAT활성이 유의적으로 개선되었으며 총 GSH함량은 genistein과 daidzein 급여군이 당뇨대조군에 비하여 유의적으로 높게 나타났다.

적혈구와 조직의 지질과산화물 함량에 미치는 영향

적혈구와 조직 중의 지질과산화물 생성정도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 일반적으로 지질과산화 반응은 주로 불포화지방산이 많은 생체막의 인지질에서 유리기반응에 의해 주로 일어나며 특히, 간조직과 같이 세포분열의 속도가 느린 조직에서 쉽게 일어난다(38). 본 실험에서 적혈구를 비롯하여 모든 조직 내 지질과산화물 함량은 *db/db*군이 *db/+*군에 비해 유의적으로 높았다. 적혈구 중의 지질과산화물 함량은 genistein과 daidzein 급여에 의한 영향이 관찰되지 않았으나 간, 신장 및 심장조직에서 지질과산화물 함량은 genistein과 daidzein 급여로 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮아짐으로써 항산화활성이 증가된 것으로 사료된다.

요 약

제2형 당뇨 동물모델(C57BL/KsJ-*db/db*)을 대상으로 대두 이소플라본의 주성분인 genistein과 daidzein의 항산화효능을 검증하고자 5주령의 수컷 C57BL/KsJ-*db/db* 마우스와 그의 이형접합체인 C57BL/KsJ-*db/+* 마우스를 2주간 환경에 적응시킨 후 비당뇨군(*db/+*), 당뇨대조군(*db/db*), genistein 급여군(*db/db-genistein*), daidzein 급여군(*db/db-daidzein*)으로 나누어 6주간 사육하였다. 실험동물의 간, 부고환지방과 신주변지방의 조직무게는 당뇨군(*db/db*)이 비당뇨군(*db/+*)에 비해 유의적으로 높았으나, 심장무게는 유의적으로 낮았다. Genistein과 daidzein 급여는 장기무게 변화에 영향을 미치지 않았다. 적혈구의 SOD와 CAT활성은 혈당과 양의 상관성을 보였으나 GSH-Px활성은 음의 상관성을 나타내었다. 따라서 SOD와 CAT활성은 *db/db*군이

*db/+*군에 비해 유의적으로 높은 반면, GSH-Px 활성은 유의적으로 낮았다. Genistein과 daidzein 급여로 *db/db*군의 증가된 CAT활성은 감소되었으며 GSH-Px활성은 높게 나타났다. 적혈구의 GSH함량은 당뇨군들이 비당뇨군에 비해 유의적으로 높았으나 genistein과 daidzein에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 간, 신장 및 심장조직 내 SOD활성은 유의적인 변화가 없었으나 간조직 중 CAT와 GSH-Px활성과 신장조직 중의 GSH-Px활성은 *db/db*군이 *db/+*군에 비하여 유의적으로 높게 나타난 반면 신장조직 중의 CAT활성과 심장조직 중의 CAT와 GSH-Px활성은 낮았다. 그러나 genistein과 daidzein 급여는 고혈당으로 인한 조직 내 CAT와 GSH-Px활성을 유의적으로 개선하였다. 적혈구를 비롯하여 모든 조직 내 지질과산화물 함량은 *db/db*군이 *db/+*군에 비하여 유의적으로 높았으나 genistein과 daidzein 급여로 간, 신장과 심장조직 중의 지질과산화물 생성이 유의적으로 억제되었다. 이와 같이 genistein과 daidzein은 제2형 당뇨동물에서 고혈당으로 야기되는 적혈구와 조직 내 항산화효소 변화를 완화하고 간, 신장 및 심장조직의 지질과산화물을 낮추는 것으로 관찰됨으로써 이들의 항산화작용을 통한 당뇨 합병증을 예방할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R08-2003-000-10323-0).

문 헌

1. Song YS, Kwon TY. 2000. Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. *Food Industry and Nutrition* 5(2): 36-41.
2. Potter SM. 1998. Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr Rev* 56: 231-235.
3. Hermansen K, Sondergaard M, Hoie L, Carstensen M,

- Brock B. 2001. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 24: 228-233.
4. FDA. 1999. Food labeling health claims: soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration. Final rule. *Fed Regist* 64: 57700-57733.
 5. Kerckhoffs DA, Brouns F, Hornstra G, Mensink RP. 2002. Effects on the human serum lipoprotein profile of beta-glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J Nutr* 132: 2494-2505.
 6. van der Schouw YT, Sampson L, Willett WC, Rimm EB. 2005. The usual intake of lignans but not that of isoflavones may be related to cardiovascular risk factors in U.S. men. *J Nutr* 135: 260-266.
 7. Bhathena SJ, Velasquez MT. 2002. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 76: 1191-1201.
 8. Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Howarth EM, Jennings PE, Hepburn DA, Atkin SL. 2002. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1709-1714.
 9. Wiseman H. 2000. The therapeutic potential of phytoestrogens. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 1829-1840.
 10. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, Rasch R. 2004. Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 53: 166-172.
 11. Aoki K, Saito T, Satoh S, Mukasa K, Kaneshiro M, Kawasaki S, Okamura A, Sekihara H. 1999. Dehydroepiandrosterone suppresses the elevated hepatic glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activities in C57BL/KsJ-db/db mice: comparison with troglitazone. *Diabetes* 48: 1579-1585.
 12. Lee SM, Bustamante S, Flores C, Bezerra J, Goda T, Koldovsky O. 1987. Chronic effects of an α -glucosidase inhibitor (Bay O 1248) on intestinal disaccharidase activity in normal and diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 132-137.
 13. Park SA, Choi MS, Cho SY, Seo JS, Jung UJ, Kim MJ, Sung MK, Park YB, Lee MK. 2006. Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sciences* 79: 1207-1213.
 14. Rüfer CE, Kulling SE. 2006. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J Agric Food Chem* 54: 2926-2931.
 15. American Institute of Nutrition. 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
 16. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyperine (hemocuperin). *J Biol Chem* 224: 6049-6055.
 17. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
 18. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
 19. Abei H. 1974. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer HU, ed. Academic Press, New York. p 673-684.
 20. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
 21. Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
 22. Tarladgis BG, Pearson AM, Dugan LR. 1964. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. *J Sci Food Agric* 15: 602-607.
 23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
 24. Aasum E, Hafstad AD, Severson DL, Larsen TS. 2003. Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. *Diabetes* 52: 434-441.
 25. Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Cooper M, Andreassen M, Larsen TS. 2002. Cardiac function and metabolism in type 2 diabetic mice after treatment with BM 17,0744, a novel PPAR- α activator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H949-H957.
 26. Clemens MR, Waller HD. 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys of Lipids* 45: 251-268.
 27. Rolo AP, Palmeira CM. 2006. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212: 167-178.
 28. Costagliola C, Menzione M. 1990. Effect of vitamin E on the oxidative state of glutathione in plasma. *Clin Physiol Biochem* 8: 140-143.
 29. Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, Siktar E, Keles S, Akar S, Akcay F, Dane S, Gul M. 2004. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocyte in rat. *Eur J Appl Physiol* 91: 622-627.
 30. Suttorp N, Toepfer W, Roka L. 1986. Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *Am J Physiol* 251: C671-C680.
 31. Diamond JR, Ding G, Frye J, Diamond IP. 1992. Glomerular macrophages and the mesangial proliferative response in the experimental nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 141: 887-894.
 32. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. 2001. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 34: 65-70.
 33. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. 1996. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 90: 255-260.
 34. Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V. 1996. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 13: 715-719.
 35. Bhatia S, Shukla R, Madhu SV, Gambhir JK, Prabhu KM. 2003. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem* 36: 557-562.
 36. Dyntar D, Sergeev P, Klisic J, Ambuhl P, Schaub MC, Donath MY. 2006. High glucose alters cardiomyocyte contacts and inhibits myofibrillar formation. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1961-1967.
 37. Song Y, Wang J, Li XK, Cai L. 2005. Zinc and the diabetic heart. *Biometals* 18: 325-332.
 38. Lelli SM, San Martin de Viale LC, Mazzetti MB. 2005. Response of glucose metabolism enzymes in an acute porphyria model. Role of reactive oxygen species. *Toxicology* 216: 49-58.

(2006년 7월 13일 접수; 2006년 8월 11일 채택)