

식이 다시마의 섭취가 당뇨 쥐 신장의 산화적 스트레스 및 당뇨성 병변에 미치는 영향⁺

박민영¹ · 김경희¹ · 정규식² · 김현아^{1*}

¹목포대학교 생활과학부 식품영양학전공, ²경북대학교 수의과대학

Effect of Supplementation of Dietary Sea Tangle on the Renal Oxidative Stress in Diabetic Rats

Min Young Park¹, Kyung Hee Kim¹, Kyu Shik Jeong², Hyeon A Kim^{1*}

¹Major in Food and Nutrition, Division of Human Ecology, Mokpo National University, Muan, Chonnam, Korea

²College of Veterinary medicine, KyungPook National University, Korea

Abstract

Diabetic nephropathy has been increasing, although blood glucose and blood pressure can be controlled by angiotensin converting enzyme(ACE) or advanced glycosylation end products(AGE) inhibitors in the diabetic patients. We investigated the effect of dietary supplementation of sea tangle on the blood glucose, and pathological scoring of diabetic kidneys in the streptozotocin(STZ) induced diabetic rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into normal rats fed control diet and diabetic rats fed control diet or control diet supplemented with powder or water extract of sea tangle. Diabetes was induced by a single injection of STZ(60mg/kg, ip) in citrate buffer. The animals were fed the experimental diet and water for 13 weeks. Dietary supplementation of sea tangle decreased blood glucose in the diabetic rats. However, dietary supplementation of sea tangle did not affect the antioxidant enzyme activities, MDA content and pathology of diabetic kidneys. These results indicate that decreased blood glucose by sea tangle could not delay the progression of diabetic kidney disease.

Key Words : sea tangle, blood glucose, diabetic kidney

1. 서 론

우리나라는 급격한 경제 발전에 따른 식생활의 서구화, 신체 활동의 감소 등의 생활양식의 변화와 인구 구성의 노령화로 만성퇴행성 질환이 증가 추세에 있다(Chai 등 2003). 식품소비패턴의 변화를 살펴보면 동물성 식품의 소비량이 현저히 증가되었고, 외식의 기회가 많아짐에 따라 지방, 특히 트랜스 지방의 섭취가 증가하고 식이섬유의 섭취는 오히려 감소하고 있다(Kye 등 1997). 이러한 식생활 패턴의 변화는 당뇨병, 심혈관계 질환, 대장암 등 만성퇴행성 질환의 발병률이 증가되는 것과 밀접한 관계가 있다(Kang 2001). 통계청에서 발표한 바에 따르면 당뇨병으로 인한 사망률이 1983년에 인구 10만명 당 4.3명으로 낮았으나, 2001년에는 23.8명으로 급격하게 증가하였으며(National statistics office 2002), 2001년도 국민건강·영양조사 결과, 당뇨병 유병률은 인구 1000명 당 25명, 65세 이상 노인의 경우는 인구 1,000명 당 99명으로 조사되었고, 2030년에는 전체 당뇨병 인구가 722만 명 정

도 급증할 것으로 예측되고 있다(Korea ministry of health and welfare 2002).

당뇨병은 인슐린 분비량이 절대적으로 부족하거나 상대적으로 결핍되어 발생하는 대사성 질환으로(Do 등 2005) 탄수화물, 지방, 단백질 등 모든 열량원의 대사를 변형시키며, 이러한 대사 이상은 고혈압, 고지혈증, 비만 및 동맥경화성 혈관장애와 신경장애 등의 합병증을 일으키게 된다. 그 중에서도 특히 미세혈관 장애로 인한 신장질환의 유발률이 높아서 당뇨 환자의 약 40 ~ 50%가 당뇨신부전으로 사망하고 있다고 보고되고 있다(George 등 2003).

당뇨병의 병태 생리에 중요한 역할을 하는 식이성분과 관련하여 해조류의 섭취가 당뇨병의 혈당조절에 효과적이라는 보고가 대두되고 있다. 해조류는 옛날부터 아시아에서 주로 소비되어왔으며, 특히 갈조류에는 섬유소, 무기질, 단백질이 풍부하게 함유되어 있고, 알긴산(alginic acid), 푸칸(fucan), 라미나란(laminaran)등 수용성 다당류가 풍부하다(Nishino 등 1991). 이들 수용성 다당류는 많이 섭취하여도 독성이 없으며 푸칸과 알긴산 유도체들은 항당

⁺ This research was supported by Ministry of Maritime Affairs & Fisheries(12004038).

* Corresponding author : Hyeon A Kim, Major in Food and Nutrition, Mokpo National University, Muan, Chonnam 532-729, Korea
Tel : 82-61-450-2525 Fax : 82-61-450-2529 E-mail: kha@mkpo.ac.kr

노, 항응고, 항염증, 항바이러스, 항종양 등의 효과가 있다고 알려져 있다(Hsueh & Anderson 1992).

본 연구는 다시마의 섭취가 당뇨병의 합병증으로 알려진 신장 기능 저하에 미치는 효과를 알아보고자 신장 조직의 당뇨병성 변화와 산화적 스트레스로 인한 지질과산화물 형성 및 항산화 효소활성에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

생후 3주령의 Sprague-Dawley종 수컷 30마리를 고

<Table 1> Classification of experimental groups

Group	Diet	Streptozotocin ¹⁾
NC	Control	-
DC	Control	+
DP	Control + Sea tangle powder	+
DW	Control + Sea tangle water extract	+

¹⁾ Streptozotocin (60mg/kg BW) was injected to rats (ip)

<Table 2> Composition of experimental diet

Component	(g/100g diet)		
	Control diet	Sea tangle powder diet	Sea tangle water extract powder diet
Casein	20.0	18.5	20.0
DL-methionine	0.3	0.3	0.3
Corn starch	54.7	47.2	50.7
Corn oil	15.0	14.8	15.0
α -cellulose	5.0	0.0	5.0
Sea tangle powder	-	15.0	0.0
Sea tangle water extract	-	-	4.0
Mineral mix	4.0 ¹⁾	3.7 ²⁾	4.0
Vitamin mix ³⁾	1.0	1.0	1.0
Total(%)	100.0	100.5	100.0

¹⁾ AIN 76 Mineral mixture. Nutritional Biochemicals, ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio Composition of mineral mixture, g/kg mixture ; Calcium phosphate dibasic 500.00g, Sodium chloride 74.00g, Potassium citrate monohydrate 220.00g, Potassium sulfate 52.00g, Magnesium oxide 24.00g, Manganous carbonate(43-48% Mn) 3.50g, Ferric citrate(16-17% Fe) 6.00g, Zinc carbonate(70% ZnO) 1.06g, Cupric carbonate(53-55% Cu) 0.30g Potassium iodate 0.01g, Sodium selenite 0.01g, Chromium sulfate 0.55g, Sucrose, finely powdered 118.0g.

²⁾ AIN 76 Mineral mixture-Sodium chloride

³⁾ Nutritional Biochemicals, ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio Vitamin mixture is composed of ; Vit. A acetate(500,000IU/g) 1.8g, Vit.D conc.(850.000 IU/g) 0.125g, α -Tocopherol(250 IU/g) 22.0g, Ascorbic acid 45.0g, Inositol 5.9g, Choline chloride 75.0g, Menadione 2.25g, P-Aminobenzoic acid 5.0g, Niacin 4.25g, Riboflavin 1.0g, Pyridoxine hydrochloride 1.0g, Calcium pantothenic acid 3.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.09g, Vit.B₁₂ 0.00135g, and Dextrose to 1kg.

<Table 3> Composition of sea tangle powder

Component	g/15g of sea tangle powder
Crude protein	1.5
Carbohydrate	7.5
Crude fat	0.2
NaCl	0.37

형사료를 먹이면서 사육환경에 적응시킨 후, 250 g 정도 되었을 때 4 개의 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다 (Table 1). 실험식은 모든 영양소를 고루 함유한 대조식이, 다시마 분말가루를 대조식에 첨가한 다시마 분말식이(15%, w/w), 다시마 물 추출물식이(4%, w/w)로 각각 사용하였다(Table 2). 다시마 물 추출물은 60℃의 물에서 24시간 추출한 후 감압 농축기로 농축하고 냉동 건조법으로 분말화한 후 식이에 첨가하였다.

실험군은 당뇨를 유도하지 않고 대조식을 섭취시킨 정상 대조식이군(Normal, control diet: NC), 당뇨를 유도한 후 각각 대조 식이를 먹인 당뇨 대조식이군(Diabetic, control diet: DC), 15% 다시마 분말식을 먹인 당뇨 다시마 분말식이군(Diabetic, sea tangle powder: DP), 4% 다시마 물추출물 식이를 먹인 당뇨 물추출물식이군(Diabetic sea tangle water extract: DW)으로 하였다. 실험식은 AIN-76 식이를 기본으로 하였고, 다시마 분말식에는 식이섭유소가 약 30% 정도 함유되어 있어 (Jang 등 2002) 그 함량에 맞추어 α -cellulose를 제한하였고, 다시마 성분 분석결과를 참고로 조 단백질, 조지방, 탄수화물 등의 함량을 고려하고 열량을 맞춰 카제인, 옥수수 전분, 옥수수유 등을 조정하였다. 또한 다시마 분말식이군의 mineral mixture는 다시마의 나트륨 양을 고려하여 염화나트륨을 제거한 mixture를 제조하였으며 식이 100g 당 첨가하는 mineral mixture중 염화나트륨이 0.3g 이므로 이를 뺀 3.7g의 mineral mixture를 첨가하였다 (Table 3). 또한 다시마 물 추출물은 Jang 등(2002)의 보고를 참고하고 본 연구에서의 다시마 추출효율을 고려하여 첨가하였다. 식이와 물은 자유롭게 먹이고 매일 신선한 것으로 공급하였다. 동물 사육실은 온도, 습도, 채광을 일정하게 유지하여 13주간 사육하였다.

2. 당뇨 유도

실험동물을 16시간 절식시키고 당뇨군은 streptozotocin (STZ)(60mg/kg B.W.)을 0.01 M citric acid buffer (pH 4.5)에 용해하여 1회 복강 주사로 당뇨를 유도하였고, 정상군은 동량의 citric acid buffer 용액을 주사하였다. 당뇨유발 여부의 확인은 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당계 (Medisense Optium, SHIBAYAGI)로 혈당을 측정하여 공복 혈당(fasting blood sugar)이 250 mg/dl 이상인 동물을 당뇨 군으로 판정하고 당뇨군의 분리는 각 군의 평균 혈당이 비슷하도록 하였다.

3. 체중, 식이 섭취량 및 수분 섭취량

매주 체중을 측정하였고 매일 식이 섭취량과 수분 섭취량을 급여량과 잔여량의 차이로 측정하였다.

4. 시료 수집 및 전 처리

당뇨 유발 13주 후 실험동물을 18시간 절식시킨 후 단두하여 희생시켰다. 신장조직을 즉시 적출하여 일부는 조직 검사를 위하여 10% 중성 포르말린에 담그고 나머지 신장조직을 ice cold homogenizing media(154 mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4)에 넣고, 4°C에서 glass teflon homogenizer로 균질화 한 다음 4°C, 12,000 x g에서 20분간 고속원심분리기로 원심 분리 하였다. 이 중 상층액을 취해 다시 4°C, 105,000 x g에서 초고속 원심분리기로 60분간 다시 원심분리 한 후 cytosol 분획과 microsome 분획으로 각각 분리하여 사용하였다.

5. 생화학적 분석

1) 혈당

혈당은 실험 시작 일주 후부터 절식 후 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당계(Medisense Optium)로 매주 측정하였다.

2) 혈액 크레아티닌의 측정

Kit(아산제약)를 이용하여 혈청에서 크레아티닌을 측정하였다.

3) 신장의 microsome의 지질과산화물 함량 측정

신장 microsome의 지질과산화물의 함량은 효소의 발색반응을 이용한 MDA kit(Osiox Research)를 사용하여 측정하였다. MDA는 45°C에서 N-methyl-2-phenylindole의 발생시약에 발색하게 되는데, 1분자의 MDA는 2분자의 N-methyl-2-phenylindole과 반응하여 Carbocyanine Dye로 안정화하게 된다. 이를 586nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA의 계산은 단백질 함량을 기준으로 하였다.

4) 신장의 glutathione 의존성 항산화 효소 분석

Habig 등(1974)의 방법을 이용하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)을 기질로 glutathione S-transferase(GST)의 활성도를 측정하였다. 반응액을 만들기 위하여 potassium phosphate buffer(pH 6.5)와 환원형 glutathione(GSH), 그리고 CDNB를 최종적으로 각각 0.1 M, 1.0 mM, 1.0 mM이 되도록 혼합하였다. 시료의 단백질 농도가 5-6 µg/ml가 되도록 희석하여 반응액과 섞고 25°C, 340 nm에서 1분간 흡광도 변화를 관찰하였다. GST의 활성도는 CDNB의 분자 흡광계수를 사용

하여 계산하였고 단백질 mg당 1분 동안 conjugate되는 CDNB의 nmole수로 표시하였다.

Total glutathione peroxidase(GPx)의 활성도 Tappel의 방법(1978)으로 측정하였다. 0.1 mM의 EDTA가 첨가된 Tris buffer (50 mM, pH7.6)에 Glutathione reductase(GR)와 NADPH, GSH를 각각 1 unit/ml, 0.12 mM 그리고 0.25 mM의 농도가 되도록 혼합하여 cytosol 분획과 함께 항온 상태를 유지하다 cumene hydroperoxide를 기질로 사용하여 GPx의 활성도를 측정하였다. GPx의 활성도는 340 nm에서 관찰된 NADPH의 산화 속도를 분자흡광계수를 이용하여 계산하여 mg 단백질 당 나타내었다.

Glutathione reductase(GR) 활성도는 Carlberg과 Mannervick의 방법(1985)을 이용하여 측정하였다. EDTA/potassium phosphate buffer(pH 7) 0.5 ml, 2 mM NADPH(in 10 mM Tris-HCl(pH 7)) 50 µl, 20 mM 산화형 glutathione(GSSG) 50 µl, 2차 증류수 300 µl를 1 µl cuvette에 넣은 후 30°C에서 시료를 첨가하여 반응을 시작시키고, NADPH의 흡광도가 감소하는 속도를 340 nm에서 측정하였다. GR의 활성도는 단백질 mg 당 1분 동안 산화되는 NADPH의 nmole 수로 표시하였다.

5) 단백질 함량 측정

Lowry 등의 방법(1951)으로 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 측정하였다.

6. 신장의 조직학적 검사

신장을 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포배하여 조직 블록으로 만들어서 4µm 절편을 만든 후 H&E 염색(hematoxylin & eosin)을 하였다. 이 조직 샘플로부터 보우만주머니의 비후(Bowman's capsule thickening), 세뇨관 상피세포의 퇴화(degeneration of tubular epithelium), 사구체 경화(glomerulosclerosis), 염증성 세포의 침윤(inflammatory cell infiltration), 세석회화(microcalcification), 세뇨관 안에 단백질성 물질들(proteinous materials in tubules), 세뇨관간질 섬유증(tubular interstitial fibrosis), 혈관 퇴화도(vascular degeneration)등을 관찰하였다.

Azan 염색은 Koneff의 방법(1938)으로 하였다. 먼저 슬라이드 표본을 5% potassium dichromate에 하룻밤 동안 반응시키고, azocamine 용액과 56°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 37°C로 식혔다. 슬라이드를 증류수로 세척하고, aniline 알코올로 세척한 뒤 산 알코올(acid alcohol)로 다시 세척하였다. 슬라이드는 5% phosphotungstic acid와 2-4 시간 동안 반응시키고, 증류수로 세척한 후 1-2시간 동안 aniline blue 용액으로 염색하였다. 슬라이드를 2분 동안 세척한 후, 70% 에틸알코올에서 100% 알코올 순으로 순차적으로 처리하였다.

면역조직화학염색을 위해, 표본을 xylene으로 탈파라핀

과정을 거친 후, rehydration한 후 메탄올에 3% hydrogen peroxide를 첨가한 용액에 40분 동안 반응시키고, 10 mmol/L citrate 완충용액(pH 6)에 담근 후 10분간 극초단파(750W)로 가열하였다. 비특이적인 단백질과의 결합을 방지하기 위하여 정상 염소혈청으로 40분간 반응시킨 후 일차항체(monoclonal mouse anti- α -SMA (Sigma), polyclonal rabbit anti-TGF- β 1 (Santacruz biotechnology))를 사용하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. Biotin이 부착된 이차 항체와 실온에서 30분 동안 반응시키고, avidin-biotin 용액(Vector Laboratories)에서 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. DAB(3,3'-diaminobenzidine (Zymed)) 용액에 담가 발색반응을 시킨 후 증류수로 발색을 정지시키고, Mayers hematoxylin로 대조염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

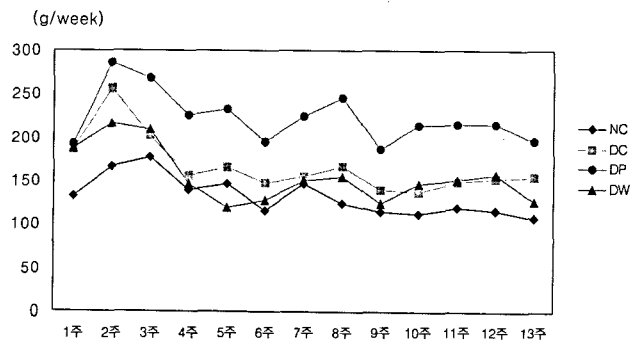
7. 통계 처리

실험결과는 SPSS Window용 version 12.0을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였고, $p < 0.05$ 수준에서 ANOVA test후 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의차를 검증하였다.

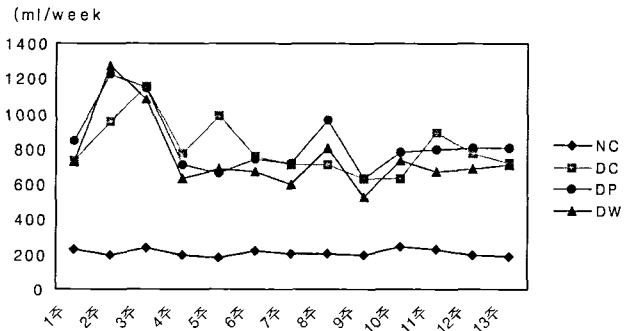
III 실험결과 및 고찰

1. 식이 섭취량 및 수분 섭취량, 체중

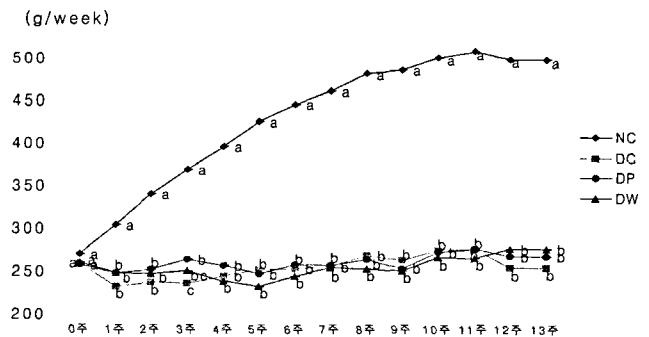
전 실험기간동안 당뇨 쥐의 식이섭취량이 정상 쥐에 비해 많은 경향을 보였으며 특히 다시마 분말을 섭취시킨 당뇨 쥐(DP)의 식이섭취량이 가장 많았으나 유의적인 차이는 없었다(Figure 1). 당뇨 쥐의 혈청 콜레스테롤과 중성지방을 저하시켜 대사 개선을 보인 식이를 섭취한 당뇨 쥐는 식이 섭취량도 당뇨 대조 식이 군에 비하여 감소하였다는 보고가 있다(Chang 등 1999; Park 등 1994). 그러나 혈당을 개선시킨 식이군의 섭취량이 당뇨 대조 식이군과 유의적으로 차이가 없었다는 보고도 있고(Kim 등 1997) 오히려 증가하였다는 보고도 있어(Lee 등 1994) 당뇨와 식이 섭취량간의 관계는 다양한 결과를 보이고 있다. 물의 섭취는 정상 쥐에 비해 당뇨 쥐의 섭취량이 유의적으로 높



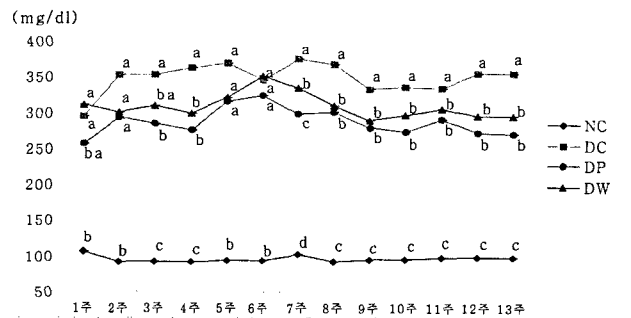
<Figure 1> Effects of dietary sea tangle on the food intake in diabetic rats



<Figure 2> Effects of dietary sea tangle on the water intake in diabetic rats



<Figure 3> Effects of dietary sea tangle on the body weight in diabetic rats



<Figure 4> Effects of dietary sea tangle on the fasting blood glucose in diabetic rats

았으며 당뇨 쥐에서 식이군 간의 차이는 없었다(Figure 2). 실험기간 동안 정상 쥐의 체중은 꾸준히 증가한 반면 당뇨 쥐의 체중은 증가하지 않아 실험 종료 시에는 정상 쥐의 50% 수준이었다(Figure 3). 이는 Streptozocin(STZ)으로 유도한 당뇨 쥐는 당질과 지질대사가 원활히 되지 않고 단백질의 이화작용이 증가되어 체중이 감소하기 때문이며(Cameron-Smith 등 1994), 체중감소는 STZ에 의해 유도된 당뇨 쥐의 당뇨유도를 확인하는 하나의 방법이다.

2. 다시마 식이의 혈당상승 억제 효과

다시마 섭취에 의한 혈당 변화를 관찰하고자 12시간 전 절식시킨 후 혈당량을 측정된 결과 <Figure 4>와 같다.

모든 당뇨군은 비 당뇨군에 비해 혈당이 모두 상승하였고, 대조식을 섭취한 당뇨 군(DC)에 비해 다시마를 섭취한 당뇨 군(DP, DW)의 혈당이 유의적으로 낮았다. 이는 다시마에 함유된 수용성 섬유소의 역할이라 사료된다. 실제로 왕겨 수용성 섬유소(rice bran fiber)가 제 1형과 제 2형 당뇨를 가진 사람들의 혈당을 유의적으로 낮추었다는 보고가 있다(Asaf 등 2002). 또한 당뇨 동물의 혈당개선과 관련된 생리학적 이점은 여러 연구에서 보고되었다. 불용성인 밀겨(wheat bran)보다 수용성 식이섬유소인 gum을 급여함으로써 STZ로 당뇨를 유도한 흰쥐에서 인슐린에 대한 감수성이 증가되어 혈당의 개선에 효과적이었다는 보고가 있으며(Cameron-Smith 등 1997), 고혈당은 지질과산화 반응을 야기하여 동맥경화를 유도 할 수 있다(Nishino 등 1991). 또한 신장에서 안지오텐시노젠(angiotensinogen)의 유전자 발현을 유도하거나 인슐린 수용체의 저항을 유도하여 당뇨병의 합병증을 일으킬 수 있다(Zhang 등 2000). 따라서 이러한 연구결과들과 연관지어 생각할 때, 다시마 섭취는 당뇨로 인한 혈당상승을 억제하여 혈관계통 합병증을 예방하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

3. 다시마 식이의 신장손상 억제 효과

1) 혈청 크레아티닌(creatinine) 농도에 미치는 영향

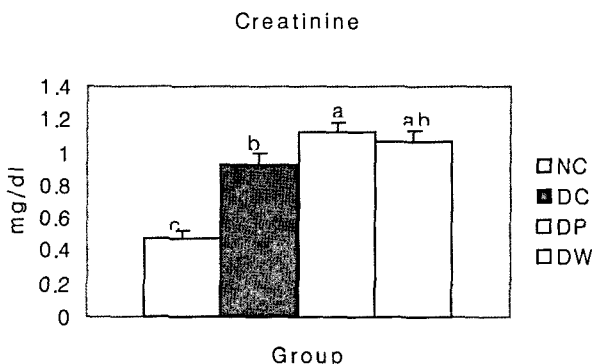
다시마 섭취에 의한 혈청 크레아티닌의 농도를 측정할 결과는 <Figure 5>와 같다. 본 연구 결과 혈액의 크레아티닌의 농도는 당뇨의 유도에 의해 유의적으로 증가하였다(NC vs DC). 그러나 당뇨 쥐에 다시마를 먹인 결과 혈중 크레아티닌의 농도가 오히려 증가하는 경향을 보였으며 특히 다시마 분말을 섭취시킨 경우(DP) 대조식을 먹인 당뇨군(DC)에 비해 유의적으로 증가하였다.

크레아티닌은 요소질소와 같이 체내에서 에너지로 사용된 단백질의 질소노폐물이다. 근육내의 크레아틴은 인산화되었다가 에너지로 사용된 후 크레아티닌으로 전환되며,

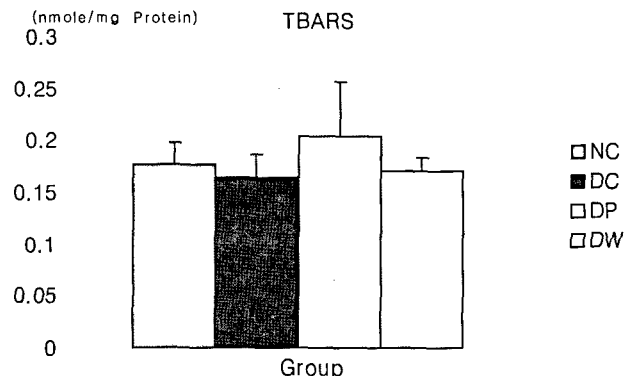
혈액으로 방출된 후 신장을 통해 배설된다. 따라서 신장의 기능이 떨어지면 신장을 통한 크레아티닌의 배설이 감소하여 혈중 크레아티닌의 농도가 증가한다(Mahan & Escott 2004). 당뇨동물의 혈장 중 크레아티닌 함량의 측정은 STZ에 의한 직접적인 신장 기능의 저하와 STZ에 의해 유발된 당뇨로 인한 이차적인 신장 기능의 손상을 간접적으로 측정할 수 있다. 본 연구에서 당뇨 유도 13주 후 동물을 희생시켰으므로 STZ에 의한 신장의 직접적인 손상을 회복되었으리라 사료되며 실험 군 간의 혈중 크레아티닌의 농도 차이는 STZ에 의해 유도된 당뇨에 의한 것(Goodman 등 1975)으로 생각된다. 그러나 상대적으로 혈당상승을 억제시킨 다시마 분말 식이 군에서 크레아티닌의 농도가 오히려 증가한 것은 다시마에 함유된 나트륨의 양을 보정하기 위하여 다시마 분말 식이군의 mineral mixture에서 염화나트륨을 제거 하였으나 여전히 대조군에 비해 나트륨 양이 높은 것이 영향을 미칠 수도 있는 것으로 사료된다.

2) 신장 microsome의 지질과산화물(TBARS)의 형성에 미치는 영향

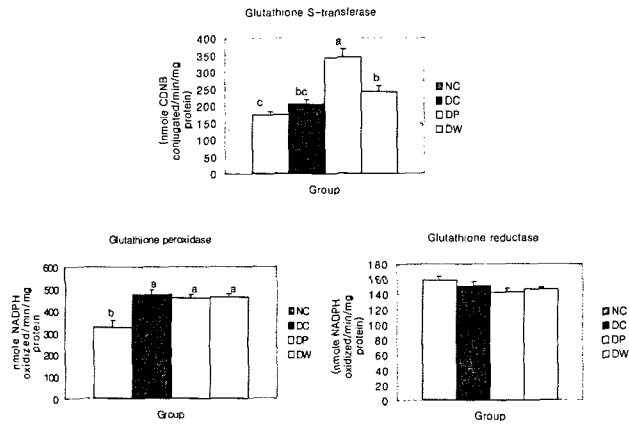
본 연구에서 당뇨 유도 후 13주 동안 사육했을 때 다시마 보충식이 신장 microsome 내 MDA 량에 유의적 영향을 미치지 못했다(Figure 6). 지질과산화반응은 자유 라디칼에 의해 생체 조직 막의 불포화지방산이 산화적 분해를 일으키는 것으로 MDA(malondialdehyde) 함량이 지질과산화의 지표로 널리 이용되고 있다(Tue-Levin 등 2003). 이러한 자유 라디칼은 당뇨병의 유발인자로서 중요한 역할을 하며, STZ로 당뇨를 유도한 쥐에서 지질과산화물이 증가되었다고 보고하였다(Garg 등 1996; Santini 등 1997). Takasu 등(1991)은 자유 라디칼은 정상적인 체내 대사과정 중에서도 생성되지만, 당뇨 쥐에서는 자유 라디칼 생성계가 정상인에 비해 더욱 촉진됨으로서 지질과산화도가 가속화되고, 따라서 조직의 과산화적 손상이 쉽게 초래된다고 보고하였다. 그리고 합병증이 없는 당뇨환자에게서 혈장의 ·OH의 증가는 성별, 나이, 흡연 등 다른 요



<Figure 5> Effect of dietary sea tangle on the serum creatinine in diabetic rats



<Figure 6> Effects of dietary sea tangle on the kidney microsomal TBARS in diabetic rats



<Figure 7> Effect of dietary sea tangle on the renal glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in diabetic rats

인에 의해서 나타나지 않았으므로 당뇨병 그 자체와 관련이 있고, 산화적 스트레스는 당뇨병 초기에 진행된다는 보고도 있다(Nourooz-zadeh 등 1997). 이러한 연구 결과를 종합해 보면 산화적 스트레스의 감소는 당뇨병의 진행을 억제하는 중요한 기전으로 생각할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 당뇨병으로 인한 혈당상승을 억제시킨 다시마 식이가 신장의 MDA 함량에 영향을 미치지 못하였으므로 신장의 산화적 스트레스 감소를 다시마의 섭취에 의한 당뇨병 동물의 혈당상승 억제 기전으로 보기는 어렵다.

3) 신장의 glutathione 의존성 항산화 효소계의 활성화에 미치는 영향

본 연구에서 실험동물에 당뇨병을 유도한 결과 정상군에 비해 GST 활성이 증가하는 경향을 보였으며 다시마 분말을 첨가한 식이를 섭취한 결과 GST 활성이 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 7). 증가된 GST는 지질과산화물과 같은 활성화된 대사물을 환원형 glutathione(GSH)과 결합시켜 배설시키는데 기여하였을 것으로 사료된다. GPx 활성도는 당뇨병을 유도한 결과 증가 되었으나 다시마 분말이나 물 추출물의 섭취에 의한 차이는 관찰할 수 없었다. GPx에 의해 생성된 산화형 glutathione(GSSG)은 glutathione reductase(GR)에 의해 GSH로 다시 환원된다(Rhee 등 1996; Yoo 등 2002). 따라서 GR은 GST나 GPx의 작용에 쓰이는 GSH를 계속적으로 공급하는 역할을 한다. 본 연구에서 당뇨병의 유도에 의해 GR의 활성의 차이가 관찰할 수 없었으며 다시마의 섭취도 당뇨병 쥐의 GR 활성에 영향을 주지 않았다.

임상적인 당뇨병이나 STZ로 유도한 당뇨병 쥐에서 자유라디칼이 증가하는 것은 잘 알려진 사실이다. 당뇨병에서 산화적 스트레스를 증가시키는 기전으로는 비효소적 당화(non-enzymatic glycosylation)와 자기 산화적 당화(autoxidative glycosylation)의 증가, 에너지 대사의 변

화에 기인한 대사적 스트레스의 증가, 항산화계의 저하를 들 수 있다(Broxnlee 등 1988; Rainer 등 2000; Rakesh 등 1997). 당뇨병에 의한 항산화 효소 활성 변화는 조직에 따라 다르게 나타나는데 중요한 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase(GR)와 glutathione S-transferase(GST) 등이 당뇨병의 유도에 의해 활성이 증가하거나 감소하는 것으로 알려져 있다 (Irizar & Ioannides 1995; Obrisiva 등 1998; Obrosova 등 2000). 단기간 당뇨병을 유도했을 때 신장의 SOD, GPx, GR, GST 등의 항산화 효소 활성이 증가한다고 보고되고 있다(Irizar & Ioannides 1995; Mak 등 1996). GPx, GR, GST와 같은 glutathione 의존성 항산화 효소는 세포의 항산화 시스템에서 가장 중요한 효소들이다(Dincer 등 2002). 본 연구의 결과를 이상의 다른 연구와 비교할 때 다시마의 섭취는 당뇨병 쥐에서 GST 활성의 증가로 활성형 대사물을 제거하는데 일부 기여할 수 있으나 전체적으로 신장의 산화적 스트레스를 억제하는 데는 크게 기여하지 못한 것으로 사료된다.

4) 신장의 병리학적 변화에 미치는 영향

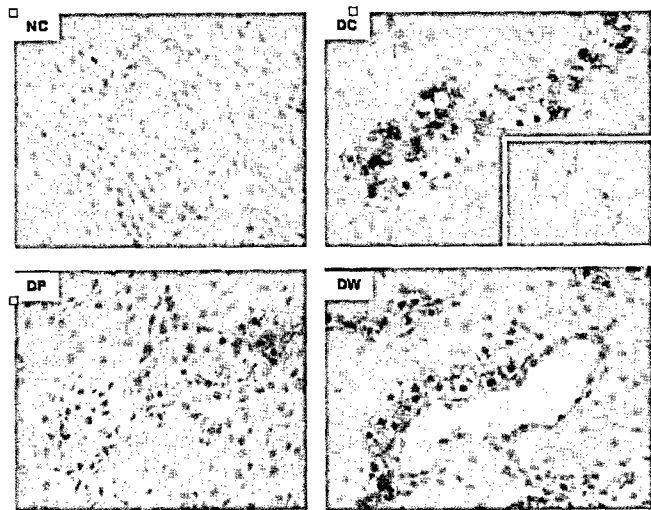
당뇨로 인한 신부전은 당뇨병의 가장 심각한 합병증으로 미국의 경우 말기 신부전 환자의 약 40%정도가 당뇨병으로 인한 것임이 밝혀졌다(Report USRDSA 1999). 최근 advanced glycosylation end products(AGE) 저해제 또는 angiotensin converting enzyme(ACE) 저해제를 이용하여 혈당과 고혈압을 비교적 강하게 조절할 수 있음에도 불구하고 당뇨병으로 인한 신부전은 계속 증가하고 있는 추세이다(Soulis 등 1999). 따라서 당뇨병 합병증으로 발생하는 신부전의 예방과 치료를 위해서는 혈당저하효과나 혈압강하 효과와 별개로 신부전이 예방될 수 있는 새로운 치료법이 개발되어야한다. 사구체 경화(Glomerulosclerosis), 세뇨관간질 섬유증(tubulointestinal fibrosis), 세동맥 유리질증(arteriolar hyalinosis) 등은 발전된 신부전증의 대표적인 증상이며 혈관간세포 간질(mesangial matrix)의 증대가 당뇨병으로 인한 신부전의 정도와 상관관계가 있음이 밝혀졌다(Kumar 등 2000). 또한 혈관간세포 간질(mesangial matrix)을 배양 했을 때 고농도의 포도당에 의해 TGF-β의 전사과정이 촉진되며 이렇게 증가된 TGF-β는 extracellular matrix (ECM) 파괴를 감소시키고 합성을 증가시켜 사구체 경화를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Kumar 등 2000).

본 연구에서 다시마 분말 및 물추출물이 당뇨병을 유도한 쥐의 신장조직과 TGF-β의 발현 및 사구체 경화 등에 미치는 영향을 살펴본 결과, 보우만주머니의 비후, 세뇨관 상피세포의 퇴화, 사구체 경화, 염증성 세포의 침윤, 세척회화, 세뇨관 안에 단백질성 물질들, 세뇨관간질 섬유증, 혈

<Table 4> Pathological scoring of the diabetic kidney in comparison with control group

	NC	DC	DP	DW
H&EG	GS(-~+)	GS(-~2+)	GS(2+~)	GS(2+~)
	MC(-~+)	MC(2+)	MC(3+)	MC(3+)
	IF	IF	IF	IF(2+)
		VD(2+~3+)	VD(3+)	VD(2+)
		DTE & PT	DTE & PT	DTE & PT
Azan	TF-	TF+~2+	TF2+	TF2+
	GS+	GS+~2+	GS2+~	GS2+~
TGF-β	-	2+~3+	3+	3+
α-SMA	-~+	+	2+	2+

BT : Bowman's capsule thickening, DTE : degeneration of tubular epithelium, GS : glomerulosclerosis,
 IF : inflammatory cell infiltration, MC : microcalcification, PT : proteinous material in tubules,
 TF : tubular interstitial fibrosis, VD : vascular degeneration



<Figure 8> Effect of dietary sea tangle on the TGF-β1 expression in the kidney of diabetic rats

관 퇴화 등 에서 유의적인 변화를 관찰하지 못했으며 (Table 4), TGF-β의 발현에도 영향을 미치지 못했다 (Figure 8). 따라서 다시마의 섭취가 당뇨 쥐의 혈당, 혈액 크레아티닌의 농도, 신장 지질과산화도, 항산화효소 활성, 및 신장 조직 등에 미치는 영향을 종합해보면 다시마의 섭취는 당뇨 쥐에서 GST 활성의 증가로 활성형 대사물을 제거하는데 일부 기여할 수 있으나 혈당상승을 억제하는 효과와 달리 전체적으로 신장의 산화적 스트레스를 억제하는 데는 크게 기여하지 못하는 것으로 사료된다. 따라서 당뇨성 신부전의 억제를 위해서는 혈당 강하효과와 별개로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 다시마를 급여한 흰쥐에게 당뇨를 유도하고 다시마 섭취가 당뇨병의 합병증으로 알려진 신장 기능 저하에 미치는 효과를 알아보고자 신장 조직의 당뇨성 변화

와 산화적 스트레스로 인한 지질과산화물 형성 및 항산화 효소활성 등을 조사 하였다. 흰쥐에서 다시마 분말가루 (15%)와 다시마 물 추출물(4%)을 식이에 첨가하고, streptozocin(STZ, 60mg/kg, BW)으로 당뇨를 유도한 후 혈당, 신장의 지질과산화도를 측정하였고, 신장조직의 병리학적 검사를 실시하였다. 당뇨유발로 인해 흰쥐의 체중감소는 현저히 나타났으며, 식이에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. 혈당변화는 당뇨 대조군에 비해 다시마 보충군에서 유의적으로 감소하였으나 다시마의 공급 형태에 따른 차이는 나타나지 않았다. 그러나 다시마의 섭취가 혈청 크레아티닌, 신장 지질과산화도, 항산화 효소 활성 등 신장의 당뇨성 변화에 미치는 영향을 관찰할 수 없었다. 또한 다시마 섭취가 당뇨를 유도한 쥐의 신장조직과 TGF-β의 발현 및 사구체 경화 등에도 유의적인 영향을 미치지 못했다. 이상과 같은 결과를 통해 볼 때 다시마의 섭취는 혈당을 낮춰줌으로서 당뇨로 인해 발생되기 쉬운 혈관계 질환의 합병증을 예방하는데 기여하리라 사료되나 신장의 산화적 스트레스를 억제하는 데는 기여하지 못하며, 따라서 당뇨성 신부전의 억제를 위해서는 혈당 강하효과와 별개로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

■ 참고문헌

Asaf A. Qureshi, Saeed A. Sami, Farooq A. Khan. 2002. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 175-187

Broxnllee M, Cerami A, Vlassara H. 1988. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J. Med.*, 318: 1315-1321

Cameron-Smith D, Collier GR, O' dea K. 1994. Effect of propionate on in vivo carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*, 43(6):

728-34

- Camerson-Smith D., Habito R., Barnett M. and Collier G. R. 1997. Dietary guar gum improves insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutrition*, 127(2): 359-364
- Carlberg I, Mannervick B. 1985. Glutathione reductase In *Methods in Enzymology*, 113: 484-499
- Chai Toung-M, Lim Ba-Kug, Lee Jong-Yoon, Kim Toung Hee, Rhee Soon Jae. 2003. Preparation of soluble dietary fiber form Oak Wood (*Quercus Mongolica*) and Its physiological function in rat fed high cholesterol diets. *Kor J. Nutrition*, 36(1): 9-17
- Chang KJ. 1999. The effects of taurine and β -alanine on blood glucose and blood lipid concentration in insulin-treated diabetic rats. *Kor J. Comm Nutr.*, 4: 103-110
- Dincer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akcay T. 2002. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control *Clinical Biochem.*, 35: 297-301
- Garg MC, Ojha S, Bansal DD. 1996. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. *Indian J. Exp Biol.*, 34(3): 264-266
- George Jerums, Sianna Panagiotopoulos, Josephine Forbes, Tanya Osicka, and Mark Cooper. 2003. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419: 55-62
- Goodman A, Goodman LS, Gilman A. 1975. The pharmacological basis of therapeutics 6th edition. Macmillan Publishing Co Inc, New York, 1651-1700
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase. *J. Biol Chem.*, 249: 7130-7139
- Hsueh WA. and Anderson PW. 1992. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetic mellitus. *Hypertension*, 20: 253-263
- Ido Wolf, Siegal Sadetzki, Raphael Catane, Avraham Karasik, Bella Kaufman. 2005. Diabetes mellitus and Breast cancer. *Oncology. thelancetcom.com* Vol 62.
- Irizar A, Ioannides C. 1995. Extrahepatic expression of P450 proteins in insulin-dependent diabetes mellitus. *Xenobiotica*, 25: 941-949
- Jang MA, Lee KS, Seo JS, Choi YS. 2002. Effects of dietary supplementation of sea tangle extracts on the excretion of neutral steroids and bile acid in diabetic rats. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.*, 31(5): 819-825
- Kang MH. 2001. Changes in recommended dietary allowances and dietary intake in Korea for year 2000. *Kor J. Nutrition* 01 Proceedings of the Korean Nutrition Society Conference, 66-75
- Kim MW, Park MH, Kim GH. 1997. Effect of mushroom protein-bound polysaccharides on blood glucose levels and energy metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J. Nutr.*, 30: 743-750
- Koneff AA. 1938. Adaptation of the mallery azan staining method to the anterior pituitary of the rat. *Stain Technol.*, 13: 49
- Korea Ministry of Health and Welfare. 2002. 2001 National Health and Nutrition Survey Report.
- Kumar Sharma, Tracy A. McGowan. 2000. TGF- β in diabetic kidney disease: Role of novel signaling pathways. *Cytokine & Growth Factor Review*, 11: 115-123
- Kye SH, Ha MF, Lee HS, Tun JS, Kim CI. 1997. Study on food intake and food consumption pattern of adults as a part of total diet study. *Kor J. Nutrition*, 30(1): 61-74
- Lee JS, Son HS, Maeng YS, Chang YK, Ju Js. 1994. Effect of buck wheat in organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J. Nutr.*, 27: 819-827
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.*, 193: 265-275
- Mahan, Escott-Stump S. 2004. Food, Nutrition, & diet therapy 11th edition. Saunders Elsevier, USA. pp 961-994
- Mak DH, Ip SP, Li PC, Poon MK, Ko KM. 1996. Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.*, 162: 153-158
- National statistics office. 2002. 2001 annual report on the Cause of Death statistics.
- Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. 1991. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant and activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed. *Ecklonia kurom*, *Agric Biol Chem.*, 55: 791-797
- Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ. 1997. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*, 40(6): 647-53
- Obrisiva, I Caso X, Greene DA Stevens MJ. 1998. Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Diabetologia*, 41: 1442-50
- Obrosova JG Greene DA, Lang HJ. 2000. Antioxidative defense in diabetic peripheral nerve: effect of DL-alpha lipoic acid, aldose reductase inhibitor and sorbitol dehydrogenase inhibitor. In: Packer L, Roosen, P, Tritschler H, King G, Azzi A, eds. *Antioxidants in diabetes management*. New York: Marcel Dekker. pp 93-110
- Park SH, Lee YK, Lee HS. 1994. The effect of dietary feeding on

- gastrointestinal functions and lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J. Nutr.*, 27: 311-322
- Rainer Lehmann, Erwin D. Schleicher. 2000. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta.*, 297: 135-144
- Rakesh Kakkar, Subrahmanyam V. Mantha, Jasim Radhi, Kailash Prasad, Jawahar Kalra. 1997. Antioxidant defense system in diabetic kidney: A time course study. *Life science*, 60(9): 667-679
- Report USRDSA. 1999. Incidence and Prevalence of ESRD. *Am J. Kidney D.*, 34SI S40-S50
- Rhee SJ, Choe WK, Cha BK, Yang JA, Kim KY. 1996. Effect of vitamin E and selenium on the antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutrition*, 29: 22-31
- Santini, S. A, Marra, G, Giardina, B, Cotroneo, P. Mordente, A. Martorana, G. E, Manto, A. Ghirlanda, G. 1997. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*, 46: 1853-1858
- Soulis T, Sastra S, Thallas v, Mortensen SB, Wilken M, Clausen JT, Bjerrum OJ, Petersen H, Lau J, Jerums G, Boel E, Cooper ME. 1999. A novel inhibitor of advanced glycation end-product formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. *Diabetologia*, 42(4): 472-472
- Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagassawa T. and Tamada T. 1991. Streptozocin and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes*, 40(9): 1141-5
- Tapple AL. 1978. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In *Methods in Enzymology*, 52: 506-13
- Tue-Levin KM, Chung WS, Leung Alvert WN, Christopher H, Cheng K, Redox. 2003. Changes precede the occurrence of oxidative stress in eyes and aorta, but not in kidneys of diabetic rats. *Life Sci.*, 73: 2557-2570
- Yoo SK, Rhee SJ. 2002. Effects of YK-209 mulberry leaves on antioxidative defense system of liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.*, 31: 1055-1070
- Zhang SL, Chen X, Hsieh TJ, Leclerc M, Henley N, Allidina A, Halle JP, Brunette MG, Filep JC, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. 2000. Hyperglycemia includes insulin resistance on angiotensinogen gene expression in diabetic rat kidney proximal tubular cells. *J. Endocrinol*, 172: 333-344

(2006년 12월 4일 접수, 2006년 2월 3일 채택)