

당뇨병 유발 흰쥐에서 헛개나무 추출물의 항산화 효과

안병수 · 김주완 · 김홍태* · 이성동 · 이근우¹

경북대학교 수의과대학, *부산광역시 보건환경연구원

(게재승인: 2010년 8월 13일)

Antioxidant Effects of *Hovenia Dulcis* in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Byung-Soo Ahn, Joo-Wan Kim, Hong-Tae Kim*, Sung-Dong Lee and Keun-Woo Lee¹

Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, 702-701, Korea

*Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 616-810, Korea

Abstract : Diabetes mellitus (DM) is one of the highest morbidity and mortality diseases and is a state of increased oxidative stress. This study was carried out to evaluate anti-oxidant activities of *Hovenia dulcis* Thunberg in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Eighty Sprague-Dawley rats, 6 week-old, were divided into 3 groups at 12 hours after STZ induction; Diabetic control group (DW *per os*; DC group), Glibencliamide group (5 mg/kg glibencliamide *per os*, GLI group) and *Hovenia dulcis* group (100 mg/kg *Hovenia dulcis* Thunberg water extract *per os*; HDT group). Normal control group (NC group) was just injected with DW instead of STZ. On day 5, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities of HDT group were significantly ($P < 0.05$) increased compared with DC group and glutathione peroxidase activities of HDT group was more increased than DC group but there was no significant difference.

Key word : *Hovenia dulcis*, Diabetes mellitus, Antioxidant, Rat.

서 론

지구자 나무(*Hovenia dulcis* Thunb.)는 한국, 일본, 중국 등 동북아시아 지역에서 자라는 갈매나무과의 낙엽활엽 교목으로 우리나라에서는 경기, 강원 이남의 표고 70-900 m의 사면이나 계곡의 비옥한 임지에서 잘 자라며, 내한성과 내음성이 강하고 맹아력이 강한 수종이다(1). 헛개나무로도 불리며 그 열매를 지구자라 하고 주취, 빈혈, 구갈, 구토, 사지마비, 류마티즘, 대소변 불통의 치료(27,34)에 쓰이며, 그 성분으로 무기질은 열매보다 잎에서 약 2-3배 정도 함량이 높고, linoleic acid, palmitric acid 등의 지방산과 glutamic acid, leucine, arginine 등의 아미노산이 다량 함유되어 있으며 총 구성아미노산 및 필수아미노산 함량은 열매보다 잎에서 훨씬 높은 것으로 보고되어 있다(23). 또한 씨와 열매의 methanol 추출물에서 (+)-ampelopsin, loricetrin, myricetin, (+)-galocatechin과 같은 flavonoid류(15)와 hovenitin I, II, III과 같은 flavonol류(51), peptide alkaloid 인 frangulanine 등(20,29), hoveniosides, jujuboside 등(51), 잎과 줄기의 물 추출물에서 vanillic acid와 ferulic acid 등(13)이 분리, 보고

되어 있다. 이외 생리활성 실험으로는 당뇨쥐에서 혈당과 간의 글리코겐에 미치는 영향(24), D-galactosamine, lipopolysaccharide와 사염화탄소에 의한 간 장애의 보호효과(32,33), streptozotocin으로 유발된 고혈당에 관한 작용(31), 알콜 분해능 및 간해독 작용(32), 항산화 및 항미생물 작용(13) 등이 보고되어 있다.

당뇨병에서는 고혈압, 동맥경화, 심근경색, 뇌질환, 신장질환, 백내장 등의 대혈관성 혹은 미세혈관성 합병증 발생률이 높고, 이러한 합병증의 발생은 산화적 스트레스와 밀접한 관련이 있는 것으로 최근 알려지고 있다(8,48). Kesavulu 등(30)은 당뇨상태에서는 산화적 스트레스에 대한 감수성이 높아져서 지질과산화 반응이 쉽게 나타나며, 이로 인하여 glutathione (GSH) 관련 항산화효소들의 활성이 감소하는 것으로 보고하였고, Hanmmers(18) 등은 고혈당의 지속화와 만성화에 의하여 여러 가지 유리라디칼의 생산이 증가되고, 반응성이 높은 이들 물질에 의해 혈관내피세포가 손상되면서 각종 혈관성 합병증이 발생된다고 보고 하였다. 따라서 당뇨 합병증의 발생 및 지연에는 조직의 산화적 손상의 감소가 중요한 것으로 알려져 있다.

생체내에서 유리라디칼 반응에 의해 생성되는 superoxide 및 hydroxyl radical 등의 활성 산소종은 일반적으로 식세포에 의한 박테리아 제거를 비롯하여 생체방어에 중요한 역할을

¹Corresponding author.
E-mail : kwolee@knu.ac.kr

수행하며, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) 및 catalase 등에 의해 조절되고 있다. 그러나 병적으로 과량 생성되는 경우 이들 유리라디칼은 세포막의 불포화 지방산을 공격하여 생체막 과산화지질을 유발하고(45), 노화, 발암, 간 질환 및 동맥경화 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(17). 생체 내에서 생성된 superoxide radical (O_2^-)과 같은 유리라디칼은 SOD에 의해 과산화수소($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로 전환되고 과산화수소는 catalase와 GSH-Px에 의해서 무독성 H_2O 로 전환되는데, 이 과정에서 세포는 산소독으로부터 보호된다. 그러나 당뇨병과 같은 병리적 상태에서는 유리라디칼 생성 자체의 증가와 이에 대한 방어기전 저하로 산소 유리라디칼에 의한 조직손상 가능성이 높으며(39), 이러한 유리라디칼 발생은 만성 합병증 발생에 관여하는 주요기전 중 하나로 생각된다. 따라서 당뇨병 환자에서 이러한 자유기를 제거하거나 이에 의한 산화성 손상을 막을 수 있는 항산화제의 강화는 만성합병증에 대한 중요한 예방과 치료법이 될 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 헛개나무 열매 열수추출물이 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 이환 흰쥐에서 간의 항산화작용에 미치는 영향을 알아보기로 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물로서 생후 6주령의 평균체중 200 g인 Sprague-Dawley계 수컷 rat 80마리 (오리엔트, 한국)를 1주일간 환경 적응 (온도: $21 \pm 2^\circ C$, 습도: $60 \pm 5\%$, 채광: 12-12 명암조명)을 시켰으며 물과 사료는 자유급식 하였다.

헛개나무 열매 열수추출물

대구시내의 한약재 상사에서 음건한 헛개나무 열매를 구입하여 분쇄한 후 분쇄물 100 g에 증류수 1 L의 비율로 가하여 항온수조(140 rpm, $37^\circ C$, 4시간)에서 진탕하였다. 이를 저온 원심분리기(3000 rpm, $4^\circ C$, 20분간)에서 원심분리한 후 여과한 상층액을 회전진공농축기로 농축, 동결건조하여 냉동보관하였다. 추출물은 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

시약 및 실험방법

Streptozotocine (STZ)은 Sigma사로부터 구입하였으며, glibenclamide (GLI, Euglucon[®]_{tab})는 종근당 제약회사 제품을 기타 시약과 용매는 1급 또는 특급시약을 사용하였다.

실험동물은 일주일 간 적응사육을 시킨 후 증류수만을 투여한 정상대조군, 당뇨유발 후 증류수만을 투여한 당뇨유발군(DC 군), 당뇨유발 후 헛개나무열매 열수추출물을 투여한 헛개나무 물추출물 투여군(HDT 군), 당뇨유발 후 glibenclamide를 투여한 대조약물 투여군(GLI군)으로 각각 16두씩 3군으로 나누었다. 당뇨유발은 12시간 절식 후 STZ 60 mg/kg을 1회 복강투여 하였으며, 정상대조군(NC 군)은 동량의 증류수를 투여하였다. STZ 투여 12시간 경과 후 각각의 약물을

존데를 이용하여 1회 경구투여 하였으며, 전 실험기간 동안 사료와 물은 자유급식 시켰다.

채혈 및 조직의 채취

실험동물은 채혈 전 12시간 동안 금식 후 ether로 마취하여 복부를 절개 후 내림대동맥에서 채혈하고 간을 적출한 다음 적출한 간은 phosphate buffered saline (PBS)로 장기표면의 혈액을 씻은 후 여지로 남아 있는 PBS를 제거한 다음 $-70^\circ C$ 에 냉동보관 후 항산화 활성검사에 이용하였다.

혈액생화학 검사

내림대동맥에서 채혈한 혈액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(Hanil micro-12, Korea) 후 혈청을 획득하여 자동혈청화학분석기(Spotchem[™] SP-4110, 고토 다이이치, 일본)로 total cholesterol 및 glucose 함량을 측정하였다. Lipase는 서울임상병리검사센터 (대구시)에 의뢰하여 검사하였다.

효소원 조제 및 분석

효소원의 조제

적출한 간 2 g에 8 ml의 buffer (pH 7.4)를 가하여 glass teflon homogenizer (Glascol[®], 099C K44, USA)로 균질화시킨 후 1차 원심분리(3,000 rpm, 14 min, $4^\circ C$)하여 상층액을 얻고, 이 상층액을 2차 원심분리(13,000 rpm, 15 min, $4^\circ C$)하여 mitochondria 분획을 얻었다. 이어서 상층액을 다시 325,000 rpm에서 1시간 동안 초원심분리(Beckman Optima TLX-120[®], USA)하여 세포질 분획을 분리하였다. Mitochondria 분획은 0.25 M sucrose 용액에 현탁시킨 다음 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, $4^\circ C$)시켜 얻은 침전물을 취하고 소량의 0.25 M sucrose 용액에 재현탁시켜 catalase 활성측정에 사용하였고, 세포질 분획은 SOD와 GSH-Px 활성도 측정에 이용하였다(Fig 1).

간의 superoxide dismutase (SOD) 측정

효소원의 조제에서 얻은 세포질 분획은 지질을 침전시키기 위해 상층액 1 ml당 0.4 ml EC solution (ethanol : chloroform = 25 : 15) 용액을 첨가하여 원심분리(1,000 rpm, 10 min, $4^\circ C$)하여 침전시킨 후 세포질과 가용성 단백질로 구성된 상층액을 얻어서 사용하였다.

SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund 방법(37)으로 측정하였다. 즉, 10 mM EDTA를 포함한 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.6) 1.5 ml에 효소원 0.1 ml와 15 mM의 pyrogallol 0.1 ml을 가하여 $25^\circ C$ 에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 50 μ l를 가하여 반응을 종결시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 단위는 효소원을 넣지 않고 반응시킨 15 mM pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는 단백질 양으로 정하였으며, 활성도 단위는 pyrogallol의 자동산화를 억제하는데 필요한 세포질 단백질에 대한 SOD unit로 하였다.

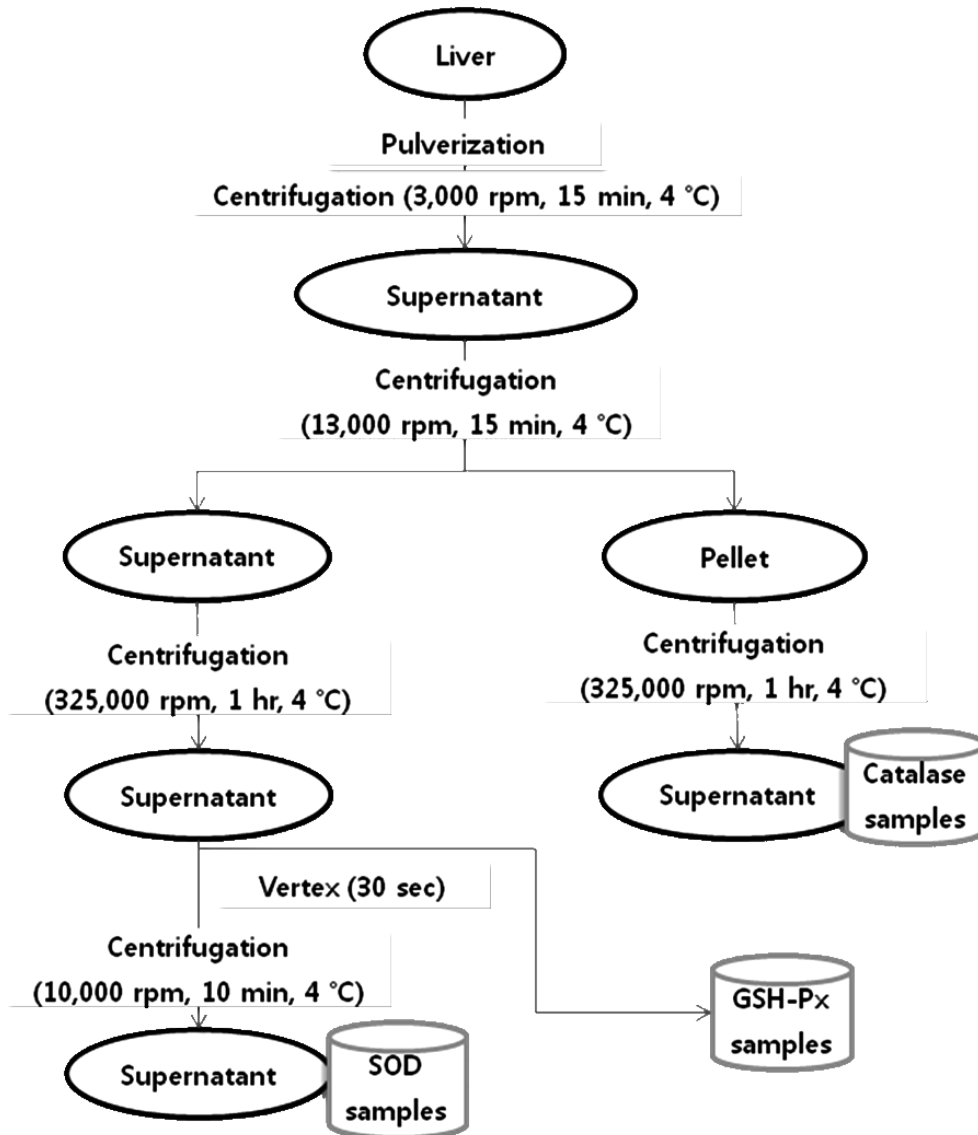


Fig 1. Diagram of antioxidant enzyme preparation.

간의 glutathione reductase (GSH-Px) 측정

GSH-Px 활성도 측정은 Paglia의 방법(42)에 따라 산화형 glutathione (GSSG)이 glutathione reductase (GR)와 NADPH에 의하여 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소하는 정도를 측정하였다. 즉, 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.2) 2.6 ml과 30mM GSH 0.1 ml을 혼합하고, 6mM NADPH 용액 0.1 ml을 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 세포질 분획 0.1 ml을 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1단위는 1분간 1 nmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양을 나타내었다.

간의 catalase 측정

Catalase 활성도는 Aebi 방법(2)으로 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 2.89 ml에 기질인 30

mM H₂O₂ 100 µl를 가하여 25°C에서 5분간 반응시켰다. 이 반응액에 효소원 10 µl를 가하여 3 ml가 되게 하고 25°C, 240 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다. H₂O₂의 흡광도 변화와 H₂O₂의 mol 흡광도계수로 H₂O₂의 농도를 구해 효소활성도를 계산하였다.

단백질 함량 측정

간 조직내의 mitochondria와 cytosol 분획의 단백질 함량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 Bradford 방법(10)에 의해 정량하였다.

통계분석

통계분석은 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test (MW test; SPSS for windows, Release 6.1.3, SPSS inc., USA) 로서 유의성을 검증하였다.

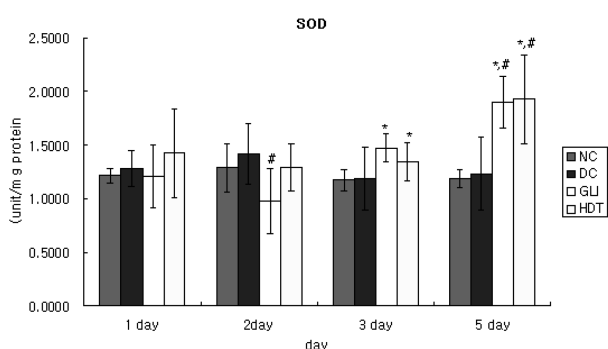


Fig 2. Changes of SOD in STZ induced diabetic rats. *P < 0.05 compared with normal control group by MW test. #P < 0.05 compared with diabetic control group. NC; normal control, DC; STZ and vehicle treated diabetic control group, GLI; STZ and glibenclamide 5 mg/kg per os treated group, HDT; STZ and *Hovenia dulcis* 100 mg/kg per os treated group.

결 과

혈액생화학검사

Glucose

당뇨유발과 그 정도를 관찰하기 위하여 희생전 12시간 동안 절식시킨 후 혈당을 측정된 결과는 다음과 같다(Fig 2). STZ 투여 후 2일째 NC군 128 mg/dl 비하여 DC군이 350 mg/dl로 유의한(P < 0.05) 증가를 나타내었다. STZ 투여 5일에는 NC군 154 mg/dl에 비하여 DC군, GLI군 그리고 HDT군이 각각 937, 967, 794 mg/dl로 유의한(P < 0.05) 증가를 보였고, DC군에 비하여 GLI군과 HDT군이 각각 3.20%와 -15.26%를 나타내었다(Table 1).

Total cholesterol

STZ 투여 1일째 GLI군이 NC군의 80 mg/dl에 비하여 62

mg/dl로 유의한(P < 0.05) 감소를 나타내었으며, 3일째에는 HDT군이 DC군 68 mg/dl에 비하여 55 mg/dl로서 유의한(P < 0.05) 감소를 나타내었다(Table 1).

Lipase

STZ 투여 1일째 NC군의 13.0 U/L에 비하여 DC군, GLI군, HDT군이 각각 20.8, 22.0, 18.5 U/L 증가하였으며, 2일에는 18.0, 21.7, 21.0 U/L, 3일에는 19.0, 13.0, 20.4 U/L, 5일에는 18.9, 17.0, 14.5 U/L를 나타내었으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 1).

항산화 활성 검사

Superoxide peroxidase (SOD)

STZ 투여 후 2일째 GLI군은 0.9770 unit/mg protein으로서 NC군의 1.2870 unit/mg protein에 비하여 유의한(P < 0.05) 감소가 인정되었다. 3일과 5일째에는 GLI군이 1.4745, 1.8982 unit/mg protein, HDT군이 1.3433, 1.9262 unit/mg protein으로서 NC군의 평균 1.1710, 1.1825 unit/mg protein에 비하여 유의한(P < 0.05) 증가를 나타내었다. 또한 5일째에는 DC군의 평균 1.2294 unit/mg protein에 비하여 GLI군과 HDT군은 각각 평균 1.8982, 1.9262 unit/mg protein으로서 유의한(P < 0.05) 증가를 나타내었다(Fig 2).

Glutathione peroxidase (GSH-Px)

STZ 투여 후 2일째 HDT군이 1.0230 nmol/min/mg protein으로 DC군 1.3448 nmol/min/mg protein에 비하여 유의한(P < 0.05) 감소를 나타내었으나, 이후 5일째 NC군이 1.2233 nmol/min/mg protein에 비하여 GLI군은 2.7257 nmol/min/mg protein, HDT군은 2.4387 nmol/min/mg protein으로 유의한(P < 0.05) 증가를 나타내었다(Fig 3).

Table 1. Changes of glucose, total cholesterol and lipase in STZ induced diabetic rats

Items		Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
Glucose	NC	128 ± 23.6	126 ± 14.8	178 ± 14.7	154 ± 45.6
	DC	290 ± 82.8	350 ± 66.7*	365 ± 92.1	937 ± 591.8*
	GLI	288 ± 33.0	317 ± 82.6	364 ± 131.0	967 ± 352.3*
	HDT	254 ± 44.9	338 ± 74.3	468 ± 380.0*	794 ± 424.5*
TG	NC	80 ± 8.1	77 ± 5.6	62 ± 7.7	74 ± 10.4
	DC	63 ± 8.3	78 ± 34.9	68 ± 15.2	64 ± 9.8
	GLI	62 ± 19.5*	77 ± 13.8	62 ± 19.3	78 ± 12
	HDT	62 ± 20.8	73 ± 14.2	55 ± 12.8#	51 ± 15.4
Lipase	NC	13.0 ± 2.1	17.0 ± 0.1	14.0 ± 0.2	13.0 ± 1.1
	DC	20.8 ± 2.4	18.0 ± 4.2	19.0 ± 1.7	18.9 ± 0.5
	GLI	22.0 ± 0.1	21.7 ± 3.0	13.0 ± 0.5	17.0 ± 4.3
	HDT	18.5 ± 0.7	21.0 ± 1.7	20.4 ± 2.2	14.5 ± 4.1

All data are represented with mean ± standard deviation. *P < .05 compared with normal control group by MW test. NC: normal control group, DC: diabetic control group, GLI: glibenclamide administrated group, HDT: *hovenia dulcis* Thernberg administrated group

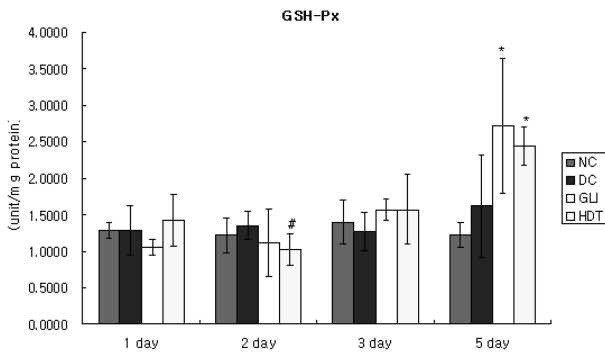


Fig 3. Changes of GSH-Px in STZ induced diabetic rats. * $P < 0.05$ compared with normal control group by MW test. # $P < 0.05$ compared with diabetic control group. NC; normal control group, DC; diabetic control group, GLI; glibenclamide treated group, HDT; *Hovenia dulcis* treated group.

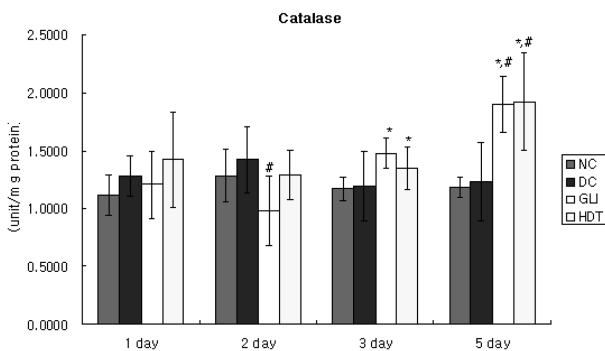


Fig 4. Changes of catalase in STZ induced diabetic rats. * $P < 0.05$ compared with normal control group by MW test. # $P < 0.05$ compared with diabetic control group. NC; normal control, DC; diabetic control, GLI; glibenclamide treated group, HDT; *Hovenia dulcis* treated group.

Catalase

STZ 투여 후 3일째 GLI군과 HDT군에서 NC군 1.1710 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein에 비하여 각각 1.4745, 1.3442 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein의 유의한($P < 0.05$) 증가를 보였고, 실험 5일째부터 NC군 1.1825 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein에 비하여 각각 1.8982, 1.9262 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein DC군 1.2294 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein에 비하여 54.41 %, 56.68 %의 유의한($P < 0.05$) 증가를 나타내었다(Fig 4).

고 찰

최근 우리나라에서는 급속한 경제성장과 더불어 식생활의 서구화 및 생활양식의 변화에 따른 각종 성인병 환자가 증가되고 있으며, 그 중에서도 당뇨병은 특히 선진국과 개발도상국에서 급증세를 보이고 있다(22).

본 실험은 당뇨병성 rat에 미치는 헛개나무 열매의 항산화적 영향을 알아보고자 STZ투여로 유발된 당뇨쥐에서 각각 헛개나무 열매 열수추출물과 당뇨치료제인 glibenclamide를 투여하여 혈중 glucose, total cholesterol, lipase 함량 변화

와 간조직에서 유리라디칼 제거효소인 항산화계 효소의 활성변화를 관찰하였다.

당뇨병에서 산화적 스트레스를 상승시키는 일반적인 기전으로는 glucose의 자동산화를 증가시키는 동안 유리라디칼 산생증가 및 hyperglycemia로 유발된 glucose의 산화를 예방할 수 있는 vitamin A, E, C, glutathione 등과 같은 내재성 항산화제의 감소와 GSH-Px와 같은 항산화제 활동의 감소이다(11,30,52).

본 실험에서는 streptozotocin 투여 후 1일째부터 glucose의 수치가 현저하게 증가하기 시작하여 실험 종료일까지 glucose의 수치가 현저하게 증가한 바, 이러한 경향은 Bayda 등(6)이 hyperglycemia 동안 조직에서는 산소 유리라디칼의 형성이 증가된다고 한 보고와 Montilla 등(40)이 STZ 유발 당뇨모델 rat에서의 glycemia, glycosylated hemoglobin, cholesterol, Triglyceride 그리고 lipoperoxide 수치가 현저하게 증가한다는 보고와 일치하는 결과로 STZ에 의한 당뇨유발이 되었다는 것을 알 수 있었으며, 또한 glucose의 대사로 인한 유리라디칼의 증가도 나타난 것으로 추측할 수 있다. 실험 5일에는 HDT군이 DC군 및 GLI군에 비하여 증가율이 둔화된 점은 당뇨로 인한 체내 합병증 발생의 위험성이 DC군이나 GLI군에 비하여 낮을 것으로 사료되며, 또한 정상 상태에서 보다 유리라디칼의 위험성은 증가하겠으나 DC군이나 GLI군에 비하여 glucose의 자동산화증가나 항산화제의 활동 감소는 적을 것이라 사료되어 헛개나무에 혈당을 감소시키는 성분이 함유되었을 것이라 추측된다.

Van Tol(46), Bar-on 등(5)은 당뇨쥐에서 당뇨가 진행될수록 혈중 very low density lipoprotein 제거율이 감소되어 혈중 중성지질이 증가된다고 하였으며, Bayda 등(7)은 STZ 유발 당뇨에서 혈장 total cholesterol, triglycerides 및 low density lipoprotein 수치가 현저하게 증가한다고 하였다. 본 실험 결과 2일, 3일에 NC군에 비하여 DC군의 total cholesterol 수치가 증가된 점으로 미루어 지금까지의 보고와 일치하는 결과라 사료되며, DC군에 비하여 GLI군이 1일부터 3일까지는 낮은 수치를 기록하였으나 5일부터는 높은 수치를 나타내었다. 이에 비해 HDT군은 실험기간 동안 DC군에 비하여 낮은 경향을 나타낸바, 이러한 결과는 Baynes(8), West(48)가 보고한 당뇨병성 쥐에서의 total cholesterol 증가 경향과 일치하는 결과이지만 이러한 경향이 정상범위 내에서의 변화로 유의성은 인정되지 않았다.

혈액내 Lipase 활성은 glucocorticoids 치료 및 여러 종류의 암 및 간담즙성 질병과 관련되어 활성화가 증가될 수 있고(43), lipoprotein lipase는 triacylglycerol이 풍부한 lipoproteins의 제거비율을 결정하는 내피에 있는 효소로 알려져 있다(44).

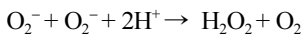
본 실험에서는 STZ 투여 1일째 NC군 13.0 U/L에 비하여 DC군, GLI군, HDT군이 각각 20.8, 22.0, 18.5 U/L 증가하였으며, 2일에는 18.0, 21.7, 21.0 U/L, 3일에는 19.0, 13.0, 20.4 U/L, 5일에는 18.9, 17.0, 14.5 U/L를 나타내었으나 유의성은 나타나지 않았으며, 모든 군에서 NC군에 비하여 증가하였다. 이러한 결과는 Aughsteen 등(3)이 보고한 STZ로

당뇨를 유발한 rat의 lipase가 증가한다는 보고와 일치하는 결과로 사료된다.

정상적인 생리상태에서는 유리라디칼의 생성계와 제거계인 항산화방어계(antioxidant defense system)가 균형을 유지하지만 내인성 또는 외인성 요소로 체내에서 유리라디칼이 과다 생성 되거나 혹은 항산화계의 활성이 감소가 되면 각종 문제점이 발생하게 된다. 당뇨병과 관련하여 산소 유리라디칼은 만성 합병증 발생에 관여하는 주요기전 중의 하나로서(19,41), 이러한 자유라디칼의 제거계인 SOD는 과산화 라디칼을 환원시켜 H₂O₂로 바꾸어 주며, 또 여기서 생성된 H₂O₂는 다시 GSH-Px와 catalase의 작용에 의해 H₂O로 배설됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다.

SOD는 과산화라디칼을 환원시켜 H₂O₂로 전환시킨 후 활성산소에 의해 유발되는 산화적 손상의 일차적 방어에 관여하고(16), 이때 생성된 H₂O₂ 등은 GSH-Px, catalase 등의 작용에 의해 H₂O로 무독화 됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호하게 된다(49).

SOD는 다음과 같은 반응에서 촉매역활을 하는 것으로 알려져 있으며,



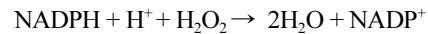
이 반응에서 dismutation 또는 disproportionation 작용은 superoxide가 산화제와 환원제의 역할을 한다는 사실 즉, 잔여 전자를 제거하거나 다른 것을 가지게 하는 성질을 이용하여 SOD가 하나의 과산화라디칼을 다른 과산화라디칼을 산화시키기 위해 이용된다는 것이다(38).

본 실험 결과 STZ투여 2일째에 glucose 함량이 STZ 투여 1일째에 비하여 증가를 나타내었으나, SOD 활성은 투여 1일째에 비하여 DC군에서 증가를 나타낸 반면 GLI군 및 HDT 군은 감소를 나타내었다. 그러나 투여 2일째를 제외한 전 기간 중 glucose의 증가에 따라 NC군, DC군의 SOD 활성은 변화가 거의 없었으나 투여 3일에 GLI군과 HDT군의 SOD활성이 NC군에 비하여 1.4745, 1.3433 unit/mg protein으로 유의한(P < 0.05) 증가를 나타내기 시작하여 투여 5일에 각각 NC군 1.1825 unit/mg protein 에 비하여 1.8982, 1.9262 unit/mg protein으로 유의한(P < 0.05) 증가를, DC군 1.2294 unit/mg protein에 비하여 유의한(P < 0.05) 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 당뇨병에서 산화적 스트레스를 일으키는 여러 종류의 원인(11,30,52) 중 내재성 항산화제의 감소를 배제시킬 수 있었으며, 또한 glucose의 자동산화가 증가됨으로써 유리라디칼 산생이 증가되어 세포손상의 유발을 예방할 수 있는 내재성 항산화제인 SOD의 기능을 증강시키는 성분이 헛개나무에 함유되어 있음을 나타내는 것이라 하겠다.

GSH-Px는 모든 포유동물의 조직에서 발견되며 환원형 glutathione (GSH)를 이용하여 H₂O₂와 organic hydroperoxides를 제거시키고 이때 생성된 GSSG는 GR에 의해 다시 환원형 GSH 의존성 산화환원 반응을 통해 세포막을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(26).

또한, GSH-Px는 체내에서 H₂O₂와 환원형 GSH에서

GSSG와 H₂O를 생성하는 반응 및 기타 과산화물(ROOH)에서 alcohol (ROH) 및 H₂O를 생성하는 반응을 촉매하며(4,9), hydrogen peroxide를 감소시키기 위하여 NADPH를 이용하는 것으로 알려져 있다.



이 효소는 hydrogen peroxide 뿐 만 아니라 lipid peroxides를 감소시킬 수 있기 때문에 biologic membranes의 구조와 기능을 유지하기 위하여 지질과산화를 예방하는 효소로 매우 중요하다(38).

본 실험결과 GSH-Px 함량은 SOD와 마찬가지로 STZ 투여 후 2일째 glucose 함량이 1일에 비하여 증가된 점에 비례하여 DC군에서는 증가를 나타낸 반면 GLI군 및 HDT군은 감소를 나타내었다. 그러나 전체적으로 glucose의 증가에 비례하여 증가되는 경향을 나타내었으며, 특히 투여 후 5일에는 NC군 1.2233 nmol/min/mg protein에 비하여 GLI군이 2.7257 nmol/min/mg protein, HDT군이 2.4387 nmol/min/mg protein 으로 유의한 증가를 나타내었다.

당뇨 합병증의 발병은 항산화 방어계의 저하에 의한 것으로 알려져 있으나 실제로는 당뇨병 유발시 조직의 항산화 효소활성 변화에 대한 일관성은 결여되어 있는 실정이다.

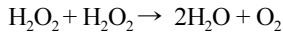
본 실험의 결과로서는 당뇨병의 이환기간이 오래될수록 GSH-Px의 활성이 더욱 감소한다는 Kesavulu 등(30)의 보고와 *in vitro* 항산화 실험에서 헛개나무 물추출물 투여군이 가장 높은 GSH-Px 활성을 나타내었다는 Hong 등(21)의 보고와는 유사한 경향을 나타내었으나 Kakkar 등(28)이 STZ 투여로 유발된 당뇨병성 rat에서 간, 신장, 심장, 및 췌장의 항산화 효소 활성을 관찰한 결과 간조직 중의 GSH-Px 활성이 당뇨군에서 높기는 하였으나 유의한 변화는 인정되지 않았다고 한 보고 및 당뇨병성 rat의 효소활성에 유의한 변화는 인정되지 않았으나 정상 rat에 비하여 높은 수치를 나타내었다고 한 Lee 등(36)의 보고와는 다른 결과를 나타내었다.

당뇨 유발군에서의 GSH-Px 활성저하는 STZ 투여로 인한 조직의 과산화적 손상에 기인하며, 헛개나무 추출물 투여시 이들 효소활성에 필수적인 세포막 소기관들을 과산화로부터 보호하여 최적조건으로 유지하는데 기여하기 때문인 것으로 생각된다.

이와 같이 STZ 유발 당뇨쥐에서 불포화지방산 함량이 높은 생체막이 산화적 스트레스에 민감하여 지질과산화가 촉진되므로 세포소기관의 산화적 손상이 가속화되어 효소활성이 저하되는 것으로 알려져 있다(12).

Catalase는 거의 모든 호기성 호흡을 하는 생물에서 발견되며 유기물, 무기물의 넓은 범위에서 과산화의 촉매역활을 하지만 catalase의 주기능은 hydrogen peroxide를 dismutation하는 촉매역활(25)로서 체내에서 지방의 자동산화, 유기물의 산화, SOD에 의해 생성된 H₂O₂를 GSH-Px와 함께 O₂나 H₂O로 분해 배설시키는 산화환원 효소의 하나로 알려져 있다(14). 또한 이러한 catalase는 hydrogen peroxide가 상당히 강한 산화제일 뿐만 아니라 약한 환원제가 될 수 있기 때문

에 SOD와 같은 방법으로 많은 작용을 하고 있다(38).



본 실험 결과 STZ 투여 후 2일째는 DC군의 glucose 함량의 증가와 함께 catalase는 증가를 나타낸 반면 GLI군 및 HDT군에서는 catalase의 감소를 나타내었다. 그러나 SOD, GSH-Px와 유사하게 catalase 활성치는 전반적으로 증가경향을 나타내었다. 특히 5일에는 NC군에 비하여 HDT군이 62.87%의 증가를, DC군에 비하여 56.68%의 유의한 증가를 나타낸 이러한 결과는 STZ 유도 당뇨쥐의 간과 신장에서 항산화 효소계인 SOD와 catalase의 활성감소를 보고한 Saleh와 David(48), STZ 유발 당뇨쥐에서 부추식이의 투여가 DC군에 비하여 SOD, GSH-Px, catalase 활성의 증가를 보고한 Lee 등(35)의 결과와 일치하는 결과를 나타내었다.

따라서 본 실험 결과 glucose 함량의 증가에 따라 내재성 항산화제인 SOD, GSH-Px, catalase가 증가하는 점으로 미루어 헛개나무 추출물에는 체내의 유리라디칼을 제거하여 당뇨의 합병증을 예방하고 세포손상을 예방하는 항산화 효소 활성을 증강시키는 성분이 함유된 것으로 확인되었으나 그 정확한 물질에 관하여서는 앞으로 지속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 김세현, 나천수, 김만조, 정남철. 헛개나무의 분포 및 증식특성. 한국임학회. 2001; 1: 123-124.
- Aebi H. Catalase. In methods of enzymatic analysis, In: Bergmeyer HU(ed), Academic Press, New York. 1974; v2: 673-698.
- Aughsteeen AA, Mohammed FI. Insulin enhances amylase and lipase activity in the pancreas of streptozotocin-diabetic rats. An in vivo study. Saudi Med J 2002; 23: 838-844.
- Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. J Biol Chem 1975; 250: 5144-5149.
- Bar-on H, Levy E, Oschry Y, Ziv E, Shafir E. Removal effect of very-low-density lipoproteins from diabetic rats. Biochim Biophys Acta 1984; 793: 115-118.
- Baydas G, Ganatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. J Pineal Res 2002; 32: 225-230.
- Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Donder E. Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta Pharmacol Sin 2005; 26:417-422.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 1991; 40: 405-412.
- Bompart GJ, Prevot DS, Bascands JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. Clin Biochem 1990; 23: 501-504.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
- Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. Diabetes Care 1997; 20: 194-197.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979; 59: 527-605.
- Cho JY, Moon JH, Park KH. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb, and confirmation of their anti oxidative and antimicrobial activity. Korean J Food Sci Technol 2000; 32: 1403-1408.
- Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. Physiol Rev 1970; 50: 319-375.
- Ding LS, Liang QL, Teng YF. Study on flavonoids in seeds of *Hovenia dulcis*. Yao Xue Xue Bao 1997; 32: 600-602.
- Flohe L. Determination of glutathione peroxidase. In CRC handbook of free radicals and oxidations in biomedicine. New York, CRC press inc 1992; p291-286.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet 1984; 1: 1396-1397.
- Hammers HD, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11555-11558.
- Harris MI, Modan M. Screening for NIDDM. Why is there no national program. Diabetes Care 1994; 17: 440-444.
- Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, Namba T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. Biol Pharm Bull 1997; 20: 381-385.
- Hong YL. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb. on antioxidative activity and the lipid metabolism. MS thesis, Kangwon National University, Gangwon. 2001; p23-34.
- Huh KB. The present status of nutrition-related diseases and its countermeasures. Korean J Nutrition 1990; 23: 197-207.
- Jeong CH, Shim KH. Chemical components in leaf fruit stalk of *Hovenia dulcis* Thunb. Korean J Postharvest Sci Technol 1999; 6: 469-471.
- Ji Y, Chen S, Zhang K, Wang W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice. Zhong Yao Cai 2002; 25: 190-191.
- Jin LH, Kim DW, Eum WS, Yoon CS, Jang SH, Choi HS, Choi SH, Kim YH, Kim SY, Jung MR, Kang TC, Won MH, Lee HY, Kang JH, Kwon OS, Cho SW, Lee KS, Park J, Choi SY. Human liver catalase: cloning, expression and characterization of monoclonal antibodies. Mol Cells 2003; 15: 381-386.
- Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contri-

- butions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2 . Arch Biochem Biophys 1981; 210: 505-516.
27. Jungyakdesajon, Sohakkyan. Sanghae Science Pub. 1985; p413-415.
 28. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. Mol Cell Biochem 1995; 151: 113-119.
 29. Kawai K, Nozawa Y, Ogihara Y. Biochemical studies on peptide alkaloids: induction of ion selective mitochondrial swelling. Experientia 1977; 33: 1454.
 30. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes levels in type 2 diabetics with microvascular complication. Diabetes Metab 2000; 26: 387-392.
 31. Kim JS, Na CS, Eun JB. Effect of Hovenia dulcis Thunb extract on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin. J Korean Soc Food Sci Nutr 2005; 34: 632-637.
 32. Kim MH, Chung YT, Lee JH, Park YS, Shin MK, Kim HS, Kim DH, Lee HY. Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of Hovenia dulcis Thunb from Korea and China. Korean J Medicinal Crop Sci 2000; 8: 225-233.
 33. Kim OK. Protective effects of extracts of Hovenia dulcis Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 2001; 30: 1260-1265.
 34. Kim TJ. Korean resources plants. Seoul national university press, Seoul, Korea 1996; p72.
 35. Lee JO, Ryu SH, Lee YS, Kim JI, Moon GS. Protective effect of dietary Buchu (*Allium tuberosum* Rottler) on oxidative stress and lipofuscin formation in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 2003; 32: 1337-1343.
 36. 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. Korean J Nutr 2001; 34: 253-264.
 37. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974; 47: 469-474.
 38. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med 2000; 108: 652-659.
 39. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055.
 40. Montillar PL, Vargas JF, Tunes IF, Munoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. J Pineal Res 1998; 25: 94-100.
 41. Osterby R. Morphometric studies of the peripheral glomerular basement membrane in early juvenile diabetes. I. Development of initial basement membrane thickening. Diabetologia 1972; 8: 84-92.
 42. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169.
 43. Richard WN, C. Guillermo C. Small animal internal medicine 3rd ed. Mosby. St. Louis Missouri. 2003; p556.
 44. Rodrigues B, Cam MC, Jian K, Lim F, Sambandam N, Shepherd G. Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on cardiac lipoprotein lipase activity. Diabetes 1997; 46: 1346-1353.
 45. Tampo Y, Tsukamoto M, Yonaha M. Superoxide production from paraquat evoked by exogenous NADPH in pulmonary endothelial cells. Free Radic Biol Med 1999; 27: 588-595.
 46. Van Tol A. Hypertriglyceridemia in the diabetic rat. defective removal of serum very low density. Atherosclerosis 1977; 26: 117-128.
 47. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabet Med 2000; 17: 171-180.
 48. Wonhaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanism in streptozotocin-induced diabetic rats. Effects of insulin treatment. Diabetes 1987; 36: 1014-1018.
 49. Yoo SK, Rhee SJ. Effect of YK-209 mulberry leaves on antioxidative defense system of liver in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 2002; 31: 1065-1070.
 50. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N. Bioactive saponins and glycosides. IV. Four methyl-migrated 16, 17-seco-dammarane triterpene glycosides from Chinese natural medicine, hoveniae semen seu fructus, the seeds and fruit of Hovenia dulcis THUNB.: absolute stereostructures and inhibitory activity on histamine release of hovenidulciosides A1, A2, B1 and B2. Chem Pharm Bull 1996; 44: 1736-1743.
 51. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomiya K, Murakami N, Matsuda H, Saito M, Fujii W, Tanaka T, Yamahara J. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II and III, isolated from hoveniae semen seu fructus, the seed and fruit of Hovenia dulcis THUNB. (Rhamnaceae): inhibitory effect of alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. Yakugaku zasshi 1997; 117: 108-118.
 52. Zaltzberg H, Kanter Y, Aviram M, Levy Y. Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. Isr Med Assoc J 1999; 1: 228-231.