[UCI]I804:24011-200000232873

2006年2月 碩士學位論文 당뇨병 흰쥐에서 식이제한이 간과 근육의 항산화효소활성도에 미치는영향 金 珍 華

2006年 2月
碩士學位論文

당뇨병 흰쥐에서 식이제한이 간과 근육의 항산화효소 활성도에 미치는 영향

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

醫 學 科

金 珍 華

당뇨병 흰쥐에서 식이제한이 간과 근육의 항산화효소 활성도에 미치는 영향

Effects of Dietary Restriction on the Activities of Antioxidant Enzymes in Liver and Muscle of Diabetic Rats

2006 2月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

醫 學 科

金 珍 華

당뇨병 흰쥐에서 식이제한이 간과 근육의 항산화효소 활성도에 미치는 영향

指導敎授 배 학 연

이 論文을 醫學碩士學位 申請 論文으로 提出함

2005 11月 30日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

醫 學 科

金 珍 華

金珍華의 碩士學位 論文을 認准함

委員長　　朝鮮大學校 敎授　　이 병 래　　印

委員　　朝鮮大學校 敎授　　배 학 연　　印

委員　　朝鮮大學校 敎授　　이 승 일　　印

*2005　11*月　*30*日

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

目　　次

表 目 次 · 2

圖 目 次 · 3

ABSTRACT · 4

Ⅰ. 序 論 · 6

Ⅱ. 硏究對象 및 方法 · 8

Ⅲ. 結 果 · 10

Ⅳ. 考察및 結論 · 12

Ⅴ. 要約 · 15

參 考 文 獻 · 25

表 目 次

표 1. *Effects of dietary restriction on the activities of catalase in liver of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats* ---------- 17

표 2. *Effects of dietary restriction on the activities of superoxide dismutase in liver of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*---------- 18

표 3. *Effects of dietary restriction on the activities of glutathione peroxidase in liver of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*---------- 19

표 4. *Effects of dietary restriction on the activities of catalase in muscle of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats* -------- 20

표 5. *Effects of dietary restriction on the activities of superoxide dismutase in muscle of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats* ---------- 21

표 6. *Effects of dietary restriction on the activities of glutathione peroxidase in muscle of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats* ---------- 22

圖 目 次

그림 1. *Effects of caloric restriction on the body weight of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats* ---------- 23

그림 2. *Effects of caloric restriction on the 12hr fasting blood glucose levels of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats* ------ 24

ABSTRACT

Effects of Dietary Restriction on the Activities of Antioxidant Enzymes in Liver and Muscle of Diabetic Rats

Kim Jin Hwa

Adviser:Prof. Bae Hak Yoen M.D, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Background : Oxidative stress is higher in obese diabetic than in non-diabetic subjects. Dietary caloric restriction(CR) without malnutrition is effective on both the control of body weight and reducing oxidative stress in obese diabetic patients. This experiments were subjected to CR and ad libitum feeding to evaluate their effects on oxidative stress in the liver and skeletal muscle of experimental animals.

Methods : The 20 weeks old rats were studied: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, as an animal model of type 2 diabetes, and control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. The experimental animals were subjected to 30% CR and ad libitum feeding for 3 weeks. The antioxidant enzyme activities in liver and skeletal muscle were measured.

Result : CR was effective in reducing body weight and blood glucose concentrations (all $p<0.01$) both in OLET rats and LETO rats. The TBARS concentration in liver was decreased significantly by CR in both OLETF and LETO rats. The activities of catalase and superoxide dismutase(SOD) were increased by CR in liver of LETO rats. However, the changes of antioxidant enzymes activities by CR in liver of OLETF rats were not significant. In skeletal muscle, CR did not produce any significant effect on the antioxidant enzyme activities in both OLETF and LETO rats.

Conclusions : These results demonstrate that CR is more effective to reduce oxidative stress in non-diabetic than diabetic animals especially in liver.

Key Words : dietary restriction, diabetes, antioxidant enzyme

Ⅰ. 서론

비만은 대사증후군의 한 요소로 지방층에서 유래된 지방세포가 대사증후군 발생과 관련됨이 밝혀지고 있으나 이로서 모든 기전이 확실히 밝혀지지는 않았다[1-3].

호기성 세포의 산소 대사 과정중 발생되는 유리 산소는 생체막의 불포화지방을 과산화 시키고 단백질이나 DNA 손상을 유발하여 산화적 세포손상을 초래한다. 생체는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSHPx) 등의 유리산소를 소거하는 항산화효소를 통해 HO같은 더 강한 유리기 형성을 막아 유리기의 생성계와 소거계의 평형을 유지시켜 생체의 항상성을 유지하고 있다[4]. 유리산소는 산화적 세포손상을 유발하여 세포 노화시 중요한 요인으로 작용하며 암이나 동맥경화증, 신경계 질환등 다양한 질환의 발생과 관련된다[5-6]. 비만 또한 유리 산소 증가와 관련되고 이는 대사증후군 발생기전중 중요한 역할을 한다는 여러 보고들이 있다[7-9].

당뇨병 또한 대사증후군의 중요한 요소로 점차 유병율이 증가되고 있다. 혈중 포도당 증가는 유리 산소와 항산화효소 방어계간의 불균형을 초래하며 이로인한 산화적 세포손상은 근육과 지방조직으로의 포도당 흡수를 저해하고 췌도 베타세포로부터 인슐린 분비를 감소시킨다[10-12]. 또한 당뇨병은 여러 조직의 심각한 대사적 불균형 및 병리학적 변화를 초래하는데 산화적 세포손상은 이러한 조직에서의 합병증 발생에 중요한 역할을 담당하여 당뇨병성 망막병증, 신증 및 신경병증등 당뇨병의 이차 합병증의 원인이 된다[11,13-14].

항산화효소 활성도의 변화 및 산화적 세포손상의 정도가 당뇨병 실험모델 동물의 여러 장기에서 연구되어져 왔다. 당뇨병 실험모델 동물로는 제1형 당뇨병 모델은 streptozocin이나 alloxan을 이용하여 췌도 베타세포를 파괴한 non-obese diabetic(NOD) 생쥐, BioBreeding(BB) 흰쥐가 알려져 있고, 제2형 당뇨병 모델은 Goto-Kakizaki(GK) 흰쥐, Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐가 알려져 있다[15-17].

Streptozocin 유발성 당뇨쥐의 적혈구 glutathione peroxidase(GSHPx) 활성도가

증가되고 신장 및 적혈구에서 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 감소되며 췌장 catalase와 SOD 활성도가 유의하게 증가되었고 제 1형 당뇨병 환자의 적혈구 SOD 활성도 감소등이 보고되어 당뇨병에서의 항산화효소 활성도의 변화를 뒷받침해준다[18-20].

식이섭취 제한은 비만한 당뇨병 환자에서 체중감소를 통해 인슐린 감수성 및 혈당조절을 향상시킨다[21,22]. 또한 체중감소에 따른 혈중 포도당 농도 감소와 수축기 혈압 감소 및 콜레스테롤 감소가 보고되었고[23], Skrha등[24]은 비만한 환자에서 단기간 식이섭취 제한이 산화적 세포손상을 감소시킴을 보고하였고 실험동물에서 식이제한에 의해 여러 장기의 항산화효소의 활성도에 변화가 유발됨이 알려져왔다. 그러나 당뇨병에서 식이제한에 의한 항산화효소의 활성도 변화에 대한 실험보고는 많지 않다.

따라서 본 연구에서는 제2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐를 이용하여 당뇨병에서 식이제한에 의한 항산화효소 활성도의 변화를 간과 근육에서 측정하여 식이제한에 따른 그 변화를 관찰하였다.

Ⅱ. 방법

1. 실험동물의 사육

실험동물은 생후 20주령의 Long Evans Tokushima Otsuka(LETO) 흰쥐와 제2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐를 사용하였다. 실험군은 Long Evans Tokushima Otsuka(LETO) 흰쥐를 정상 대조군으로, Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐에서 혈당이 150mg/dL 이상인 흰쥐를 당뇨군으로 하였다. 실험은 LETO종과 OLETF종을 식이 급여량 30% 로 제한하여 사육하면서 시간 경과에 따라서 3일, 7일, 14일, 21일후에 체중과 혈당을 측정하고, 실험쥐를 희생시켜 간과 둔부의 근육을 적출하여 실험에 사용하였다.

2. 시료의 조제

흰쥐는 ether 마취후 간장과 둔부의 근육을 적출하였다. 적출된 간장과 둔부의 근육은 즉시 dry ice-ethanol 혼합액으로 냉동시켜서 -80℃에서 보관하였다. 조직 일부를 절제하여 20배 용량(w/v)의 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 가한후 ice jacket 상태에서 polytron homogenizer로 12000 rpm에서 15초씩 3회 반복하여 균질화시켜 4℃에서 10000×g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도 측정의 조효소액으로 사용하였다.

3. Superoxide dismutase 활성도 측정

SOD 활성도는 Crapo 등[25]의 방법에 의해서 측정했다. 즉 시험관에 0.1 mM EDTA와 0.2 mM KCN를 함유한 100mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.3 mL에 0.5 mM xanthine 0.3 mL와 0.1 mM cytochrome C 0.3 mL를 넣고 혼합한후 25℃에서 3분동안 방치한 후 cuvette으로 옮겨 xanthine oxidase 용액을 가하여 UV-spectrophotometer(Gilford 2000)로 550 nm에서 1분간 변화되는 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가 속도가 매분당 0.020이 되게 xanthine oxidase량을 조절하였다. 효소의 활성도는 상기 조건에서 조효소액 0.01 mL를 가하고 흡광도 변화를 측정하

였으며, cytochrome C 환원속도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

4. Catalase 활성도 측정

Catalase 활성도는 Aebi[26]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.0 mL에 조효소액 0.05 mL를 가하여 혼합한 후 25℃에서 3분동안 방치한 후 10 mM H_2O_2 용액 1.0 mL를 가하여 혼합하고 즉시 240 nm에서 15초간 변화되는 흡광도를 측정했다. 효소의 활성도는 1분동안에 1 uM의 H_2O_2를 분해시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

5. Glutathione peroxide 활성도 측정

GSHPx 활성도는 Flohe 등[27]의 방법으로 측정하였다. 즉 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 100 mM EDTA 0.03 mL, 100 mM GSH 0.03 mL 및 45/mL glutathione reductase 0.03 mL를 넣고 37℃에서 5분간 방치한후 15 mM NADPH 0.03 mL와 45 mM H_2O_2를 최종 농도가 0.01 mM이 되게 가한 후 조효소 용액 10 uL를 가하여 340 nm에서 3분동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 효소액을 가하지 않고 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하였고, 효소활성도는 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 감한 값을 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$A=0.868([NADPH]/[GSH]0t)(Vi/Vs)$$

여기서 A = 효소 활성도, [NADPH]: NADPH 농도변화, [GSH]0: GSH의 처음농도, t: 반응시간, Vi: 반응액의 용량 및 Vs: 효소액의 용량이다.

6. 혈당측정

혈당의 측정은 hexokinase(HK)와 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)를 사용하여 생화학 자동분석기(Hitachi 717, Japan)를 이용하여 측정하였다.

Ⅲ. 결과

1. 식이제한에 의한 체중변화

체중은 에너지 섭취량과 에너지 소모량의 균형에 의해 유지되며 식이 제한은 체중에 직접적인 영향을 미칠 수 있다. 본 실험에서 체중 512.50±27.80 g인 LETO 흰쥐를 식이 급여량을 30% 제한하여 사육결과 21일후 체중이 469.30±19.70 g으로 실험시작때의 체중에 비하여 8.4% 감소($p<0.01$) 되었다. 또한 체중 562.80±29.70 g인 OLETF 흰쥐는 식이 급여를 30% 제한하여 사육결과 21일후 체중이 501.40±24.20 g으로 실험 시작때의 체중에 비하여 10.9% 감소($p<0.01$) 하였다(그림 1).

2. 식이제한에 의한 혈당변화

LETO 흰쥐는 실험 시작때의 12시간 공복후 혈당 89.50±7.90 mg/dL에서 21일후 82.60±6.10 mg/dL으로 7.7% 감소($p<0.01$)를 보였으며 OLETF 흰쥐는 실험시작때의 12시간 공복후 혈당 156.70±12.40 mg/dL에서 21일후 121.50±11.00 md/dL로 22.4%의 감소($p<0.01$)를 보였다(그림 2).

3. 식이제한이 흰쥐의 간의 항산화효소 활성도에 미치는 영향

간의 catalase 활성도는 LETO 흰쥐에서 실험 시작때의 19.10±1.80 U/mg protein에서 30% 식이 제한을 시행한 21일후 24.40±0.93 U/mg protein으로 27.7%의 유의한 상승($p<0.01$)이 관찰되었고 OLETF 흰쥐에서는 실험시작때의 24.00±1.60 U/mg protein에서 식이제한 21일후 25.20±2.10 U/mg protein으로 5%의 상승을 보였으나 유의하지는 않았다(표 1). 간의 SOD 활성도는 30% 식이제한 결과 LETO 흰쥐에서 11.20±0.40 U/mg protein에서 식이제한 21일후 16.70±1.41 U/mg protein로 32.9%의 유의한 상승($p<0.01$)을 보였고 OLETF 흰쥐는 11.10±0.84 U/mg protein에서 식이제한 21일후 13.14±1.10 U/mg protein으로 15.5%의 상승을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(표 2). 간의 GPX 활성도는 LETO 흰쥐에서 5.85±0.21 U/mg protein에서 식이제한 21일후 6.45±0.51 U/mg protein로 9.3%의 상승을 보였고

OLETF 흰쥐의 경우 6.33±0.39 U/mg protein에서 식이제한 21일후 6.12±0.72 U/mg protein로 3.3%의 상승을 보였으나 모두 유의하지는 않았다(표 3).

4. 식이제한이 흰쥐의 근육 항상화효소 활성도에 미치는 영향

30% 식이 제한을 시행한 21일후 근육의 catalase활성도는 LETO 흰쥐에서 실험시작때의 1.59±0.16 U/mg protein에서 1.67±0.15 U/mg protein로 4.7%의 상승을 보였고 OLETF 흰쥐에서는 실험시작때의 1.18±0.13 U/mg protein에서 1.45±0.17 U/mg protein로 18.6%의 상승이 관찰되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(표 4). 근육의 SOD활성도는 LETO 흰쥐에서 1.92±0.08 U/mg protein에서 식이제한 21일후 1.97±0.15 U/mg protein로 2.5%가 상승되었고 OLETF 흰쥐에서 1.91±0.11 U/mg protein에서 식이제한 21일후 2.04±0.17 U/mg protein로 6.3%로 상승되었으나 유의하지는 않았다(표 5). 근육의 GPX활성도는 LETO 흰쥐의 경우 1.61±0.18 U/mg protein에서 식이제한 21일후 1.71±0.19 U/mg protein로 5.8%의 상승을 보였고 OLETF 흰쥐에서는 1.73±0.09 U/mg protein에서 식이제한 21일후 1.81±0.17 U/mg protein로 4.4%의 상승을 보여 유의한 변화는 없었다(표 6).

Ⅳ. 고찰 및 결론

에너지 섭취량과 소모량의 균형에 의해서 체중은 유지되며 에너지 섭취량이 소모량보다 더 많으면 체중이 증가하고 소모량이 더 많으면 체중은 감소한다. 따라서 식이섭취 제한은 체중에 직접적인 영향을 미칠 수 있다. Park등[28]의 실험결과에 의하면 흰쥐에서 100% 식이를 제한한 결과 체중이 2일 경과후부터 감소하기 시작하여 7일째는 27%가 감소한다고 보고하였다. 식이제한이 당뇨흰쥐의 체중에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험에서는 30% 식이제한을 시행하였다. 그 결과 식이제한 21일후 LETO 흰쥐는 체중이 512.50±27.80 g에서 469.30±19.70 g로 8.4% ($p<0.01$)의 유의한 감소를 보였고 OLETF 흰쥐에서도 체중이 562.80±29.70 g에서 501.40±24.20 g로 10.9% ($p<0.01$)의 유의한 감소를 보여 식이제한이 체중감소에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

비만한 당뇨병 환자에서 체중감소는 인슐린 감수성 및 혈당조절을 향상시키며 여러 장기의 항산화효소의 활성도에 변화가 유발됨이 알려져왔다[21,22]. 본 실험에서 체중 감소에 따른 식이제한 21일후 12시간 공복시 혈당은 LETO 흰쥐에서 89.50±7.90 mg/dL에서 82.60±6.10 mg/dL으로 7.7%의 유의한 감소를 보였고 OLETF 흰쥐에서도 156.70±12.40 mg/dL에서 121.50±11.00 md/dL로 22.4%의 유의한 감소를 보였다. 비만형 당뇨병 환자에서 체중의 감소는 인슐린의 감수성을 증가시킬 수 있으므로 제 2형 당뇨병 흰쥐인 OLETF 종 당뇨군에서 식이제한 30% 급여에 따른 체중 감소는 체중 증가로 인한 인슐린 반응성 감소를 방지할 수 있을 것 으로 생각된다.

산소 유리기(oxigen free radical)은 생체물질의 자가산화나 paraquat같은 화학물질등에 의해서 생성되며 불포화지방산에 작용하여 지질 과산화를 유발하고 단백질의 thiol기를 산화시키거나 교차결합을 일으켜 단백질을 불활성화시키고 DNA를 손상시키는 독성이 큰 물질이다[5]. 유리기에 의한 세포손상은 유리기의 생성량 증가

나 소거량 감소에 의해서 초래될 수 있는데 이는 항산화효소인 SOD, catalase 및 GSHPx의 활성도 변화에 의해서 일어날 수 있다[10]. SOD는 superoxide anion(O_2)을 과산화수소로 전환시키는 효소이며, catalase와 peroxidase는 과산화수소를 소거하는 효소로 유리기의 생성계와 소거계의 평형유지는 생체의 항상성 유지에 매우 중요하다[5].

식이섭취 제한은 항산화계 효소의 활성도에 변화를 유발하게 된다. Rao 등[29]은 생후 21개월 및 28개월된 흰쥐에서 40% 부분절식결과 간의 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도가 증가되고 특히 catalase가 가장 큰 효소활성도 증가를 나타냈다고 하였고, Xia 등[30]은 16개월 및 26개월된 흰쥐의 40% 부분절식시킨 간 및 신장 SOD, catalase 및 GSHPx 활성도는 모두 증가된다고 하였다. 그러나 Lammi-Keefe 등[31]은 생후 41일된 흰쥐를 2일간 완전절식시킨 결과 근육의 catalase 활성도는 2배정도 증가되었으나 SOD 활성도는 변화가 없었고 심장에서의 catalase, SOD 모두 효소 활성도에 변화가 없다고 하였다. 이는 식이 제한에 의한 효소 활성도 변화는 실험동물의 연령, 식이제한의 정도 및 기간과 장기에 따라서 다르다는 것을 보여준다.

또한 당뇨병 환자에서 적혈구 SOD 및 GSHPx 활성도의 감소 및 실험적으로 당뇨병을 유발시킨 동물의 여러장기에서 SOD, catalase. GSHPx 활성도 및 지질과산화물의 양의 변화들이 보고되면서 당뇨병은 항산화계의 변화가 초래되는 질환으로 알려져 있다. Matkovics등[32]은 streptozocin 유도성 당뇨쥐의 간, 신장 및 적혈구에서 CuZn-SOD의 활성도가 감소됨을 보고하였으며, Gruno등[33]은 소아당뇨병 환자에서 적혈구 CuZn-SOD와 GSHPx의 활성도가 의의있게 감소됨을 보고하였고, Saleh등[34]은 streptozocin유도성 당뇨쥐의 췌장에서 catalase 활성도가 의의있게 증가함을 보고하였다. 이러한 보고들은 항산화계의 변화가 당뇨병의 병태와 관련된 중요한 소인임을 뒷받침해준다.

본 실험에서는 당뇨병에서 식이제한에 의한 항산화효소 활성도의 변화를 관찰하기 위하여 제2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐를 이용하여 간과 근육에서 항산화효소 활성도를 측정하여 식이제한에 따른 그 변화를 관찰하였다. 실험결과 정상 대조군인 LETO 흰쥐에서 30% 식이 제한 21일

후 간의 catalase활성도가 실험시작때의 19.10±1.80 U/mg protein에 비하여 24.40±0.93 U/mg protein로 27.7%의 유의한 상승($p<0.01$)을 보였고 간의 SOD 활성도가 실험시작때의 11.20±0.40 U/mg protein에서 16.70±1.41 U/mg protein로 32.9%의 유의한 상승($p<0.01$)을 보였다. 반면 당뇨군인 OLETF 흰쥐의 경우 간의 catalase 및 SOD 의 활성도는 유의한 상승을 보이지 않았다. 간의 GSHPx의 활성도는 정상대조군인 LETO 흰쥐와 당뇨군인 OLETF 흰쥐 모두에서 유의한 상승을 보이지 않았다. 30% 식이제한을 시행한 21일후 근육에서 측정한 SOD, catalase 및 GSHPx의 활성도는 LETO흰쥐, OLETF 흰쥐 모두에서 유의한 상승을 보이지 않았다. 이는 식이제한에 의한 항산화 효소의 활성도의 변화가 장기의 종류나 효소의 종류에 따라서 차이가 있다는 실험결과[33]와 유사하다.

이상의 결과 간의 항산화효소 활성도가 가장 큰 변화를 나타내어 식이제한이 간의 효소에 가장 큰 영향을 주는 것으로 보이며 근육조직에 미치는 영향은 적을것으로 사료된다. 또한 식이제한에 의한 항산화효소 활성도의 증가효과가 정상 대조군인 LETO 흰쥐에 비하여 당뇨군인 OLETF 흰쥐에서 더 적게 나타나 식이제한에 의한 항산화반응의 변화가 당뇨병 형태에는 영향이 더 적은것으로 추측된다.

Ⅴ. 요약

연구배경: 호기성 세포의 산소대사 과정중 발생되는 유리산소는 산화적 세포손상을 초래하며 이는 당뇨병의 만성합병증, 비만, 노화와 관련된다고 생각되어진다. 생체는 유리산소를 소거하는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSHPx)등의 항산화효소를 통하여 유리기의 생성계와 소거계의 평형을 유지시켜 생체의 항상성을 유지하고 있다. 제2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐와 정상 대조군으로 Long Evans Tokushima Otsuka(LETO) 흰쥐를 이용하여 식이제한에 따른 체중 및 혈당의 변화정도와 간과 근육에서의 항산화효소의 활성도를 측정하여 식이제한이 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

방법: 제2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima fatty(OLETF) 흰쥐와 정상 대조군으로 Long Evans Tokushima Otsuka(LETO) 흰쥐를 30%로 식이를 제한하여 사육하면서 시간경과에 따라서 3일, 7일, 14일, 21일후에 체중과 혈당을 측정하고, 실험쥐를 희생시켜 간과 둔부의 근육을 적출하여 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSHPx)의 활성도를 측정하였다.

결과: 30% 식이제한 21일후 LETO 흰쥐는 실험시작때의 체중 512.50±27.80 g에 비하여 469.30±19.70 g로 8.4%의 유의한 감소($p<0.01$)를 보였고 체중 562.80±29.70 g인 OLETF 흰쥐는 501.40±24.20 g로 10.9%의 유의한 감소($p<0.01$)를 보였다. 또한 12시간 공복후 혈당은 실험시작때와 비교하여 30% 식이제한 21일후 LETO 흰쥐에서는 혈당 89.50±7.90 mg/dL에서 82.60±6.10 mg/dL으로 7.7%의 유의한 감소($p<0.01$)를 보였고 OLETF 흰쥐에서는 혈당 156.70±12.40 mg/dL에서 121.50±11.00

md/dL로 22.4%의 유의한 감소($p<0.01$)를 보였다. 항산화효소 활성도의 경우 LETO 흰쥐의 간에서 catalase의 활성도는 실험 시작때의 19.10±1.80 U/mg protein에서 30% 식이 제한을 시행한 21일후 24.40±0.93 U/mg protein으로 27.7%의 유의한 상승($p<0.01$)을 보였고 간의 SOD 활성도 또한 11.20±0.40 U/mg protein에서 16.70±1.41 U/mg protein로 32.9%의 유의한 상승($p<0.01$)이 관찰되었으나 OLETF 흰쥐의 경우 유의한 상승을 보이지 않았다. 간의 GSHPx의 활성도는 LETO 흰쥐와 OLETF 흰쥐 모두 유의한 상승을 보이지 않았다. 근육에서의 SOD, catalase 및 GSHPx의 활성도는 LETO 흰쥐와 OLETF 흰쥐 모두 유의한 상승을 보이지 않았다.

결론: 식이제한에 의한 항산화효소 활성도의 변화는 장기의 종류나 효소의 종류에 따라서 차이가 있는 것으로 보인다. 간에서 항산화효소 활성도의 가장 큰 변화를 나타내어 식이제한이 간의 효소에 가장 큰 영향을 주는 것으로 보이며 근육조직에 미치는 영향은 적을것으로 생각된다. 또한 식이제한에 의한 항산화효소 활성도의 증가효과가 정상 대조군인 LETO 흰쥐에 비하여 당뇨군인 OLETF 흰쥐에서 더 적게 나타나 식이제한에 의한 항산화반응의 변화가 당뇨병 형태에는 영향이 더 적은 것으로 추측된다.

표 1. *Effects of dietary restriction on the activities of catalase in liver of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*

Days	Catalase (U/mg protein)	
	LETO	OLETF
0 day	19.10±1.80	24.00±1.60
3 day	19.60±0.40	23.60±1.10
7 day	20.30±2.20	21.50±1.40
14 day	23.10±1.10	24.10±1.50
21 day	24.40±0.93*	25.20±2.10

Values are mean±SD, n=7.

*$p<0.01$ vs each control diet group

LETO: Long Evans Tokushima Otsuka,

OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty

표 2. *Effects of dietary restriction on the activities of superoxide dismutase in liver of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*

Days	Superoxide dismutase (U/mg protein)	
	LETO	OLETF
0 day	11.20±0.40	11.10±0.84
3 day	12.20±1.10	11.21±0.87
7 day	13.10±1.20	10.81±0.85
14 day	15.80±1.61	12.47±0.48
21 day	16.70±1.41*	13.14±1.10

Values are mean±SD, n=7.

*$p<0.01$ vs each control diet group

LETO: Long Evans Tokushima Otsuka,

OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty

표 3. *Effects of dietary restriction on the activities of glutathione peroxidase in liver of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*

Days	Glutathione peroxidase (U/mg protein)	
	LETO	OLETF
0 day	5.85±0.21	6.33±0.39
3 day	5.82±0.33	6.51±0.60
7 day	5.94±0.42	6.78±0.42
14 day	6.66±0.48	6.84±0.45
21 day	6.45±0.51	6.12±0.72

Values are mean±SD, n=7.

LETO: Long Evans Tokushima Otsuka,

OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty

표 4. *Effects of dietary restriction on the activities of catalase in muscle of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*

Days	Catalase (U/mg protein)	
	LETO	OLETF
0 day	1.59±0.16	1.18±0.13
3 day	1.68±0.15	1.56±0.15
7 day	1.39±0.11	1.58±0.17
14 day	1.63±0.18	1.65±0.18
21 day	1.67±0.15	1.45±0.17

Values are mean±SD, n=7.

LETO: Long Evans Tokushima Otsuka,

OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty

표 5. *Effects of dietary restriction on the activities of superoxide dismutase in muscle of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*

Days	Superoxide dismutase (U/mg protein)	
	LETO	OLETF
0 day	1.92±0.08	1.91±0.11
3 day	1.85±0.10	1.95±0.09
7 day	1.85±0.13	1.78±0.08
14 day	1.94±0.18	1.87±0.16
21 day	1.97±0.15	2.04±0.17

Values are mean±SD, n=7.

LETO: Long Evans Tokushima Otsuka,

OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty

표 6. *Effects of dietary restriction on the activities of glutathione peroxidase in muscle of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats*

Days	Glutathione peroxidase (U/mg protein)	
	LETO	OLETF
0 day	1.61±0.18	1.73±0.09
3 day	1.65±0.17	1.80±0.18
7 day	1.80±0.14	1.58±0.04
14 day	1.65±0.16	1.79±0.22
21 day	1.71±0.19	1.81±0.17

Values are mean±SD, n=7.

LETO: Long Evans Tokushima Otsuka,

OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima fatty

그림 1. Effects of caloric restriction on the body weight of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats.

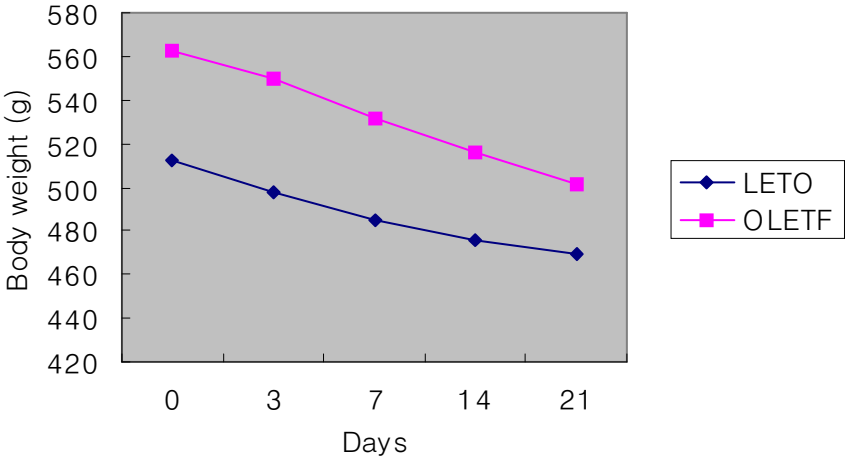
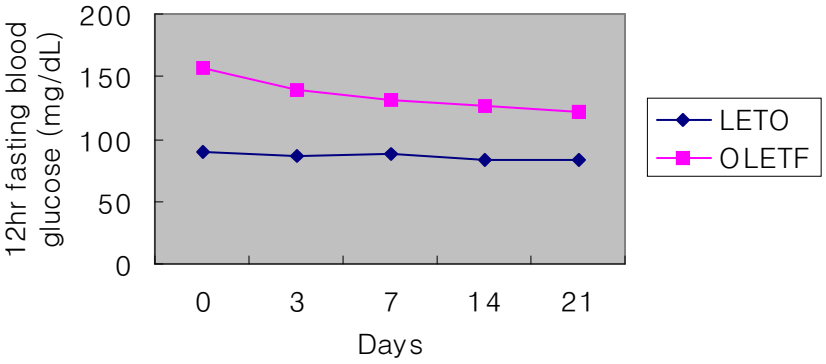


그림 2. Effects of caloric restriction on the 12hr fasting blood glucose levels of control(LETO) and diabetic(OLETF) rats.



참고문헌

1. Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. Diabetes 49:883-888, 2000
2. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: Contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. Ann N Y Acad Sci 892:146-154, 1999
3. Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. Annu Rev physiol 65:333-347, 2003
4. Arthur JR. The glutathione paroxidase. Cell Mol Life Sci 57:1825-1835, 2000
5. Knight JA. Disease related to oxigen-derived free radicals. Ann Clin Lab Sci 25:111-121, 1995
6. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet 344:796-798, 1994
7. Shigetada F, Takuya F, Michio S, Masanori I, Yukio Y. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest 114:1752-1761, 2004
8. Pazny M, Skrha J, Hilgertova J. Plasma malonidialdehyde and obesity: is there a relationship?. Clin Chem Lab Med 37:1129-1130, 1999
9. Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress - a direct link to CVD?. Arterioscl Thromb Vasc Biol 23:365-367, 2003
10. Matsuoka T et al. Glycation-dependent, reactive oxygen species-medicated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. J Clin Invest 99:144-150, 1997
11. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabetic Med 17:171-180, 2000
12. Joseph L, Evans ID, Goldfine BA, Maddux. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes.

Endocrine Rev 23:599-622, 2002
13. Baynes JW, Thorpe SR. The role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. Diabetes 48:1-9, 1999
14. Michael B. The pathobiology of diabetic complications. Diabetes 54:1615-1625, 2005
15. Rabinovitch A. Animal models of type 1 diabetes are relevant to human IDDM-use caution. Diabetes Metab Rev 14:189-190, 1998
16. Scott FW, Cloutier HE, Kleemann R, Woerz PU, Rowsell P, Modler HW, Kolb H. Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells. Diabetes 46:589-598, 1997
17. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-time hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) starin. Diabetes 41:1422-1428, 1992
18. Loven D, Schedl H, Wilson H, Dabes TT, Stegink LD, Diekus M, Oberley L. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxidase dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. Diabetes 35:503-507, 1986
19. Loven DP, Schedl H, Oberley LW, Wilson H, Bruch L, Niehaus CN. Superoxide dismutase activity in the intestinal mucosa of the steptozocin diabetic rat. Endocrinology 111:737-742, 1982
20. Hagglof B, Marklund SL, Holmgren G. Cu, Zn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocyte and erythrocytes in insulin dependent diabetic children. Acta Endocrinologica 102:235-239, 1983
21. Simonen P, Gylling H, Miettinen TA. Acute effects of weight reduction on cholesterol metabolism in obese type 2 diabetes. clin Chim Acta 316:55-61, 2002

22. Kuwajima M, Kuroda I, Mizuno A, Murakami T, Shima K. The preventive effect of caloric restriction and exercise training on the onset on NIDDM in a rat model. Nutr Res 19:401-413, 1999
23. Capstick F, Brooks BA, Burns CM, Zikerns RR, Steinbeck KS, YUE DK. Very low calorie diet: a useful alternative in the treatment of obese NIDDM patient. Diabetes Res Clin Pract 36:105-111, 1997
24. Skrha J, Kunesova M, Hilgertova J, Weiserova H, Krizova J, Kotrlikova E. Short-term very low calory diet reduces oxidative stress in obese type 2 diabetic patients. Physiol Res 54:33-39, 2005
25. Crapo CH, McCord JM, Fridovich I. Preperation and assay of superoxide dismutase. In Methods in Enzymol, Fleischer S, Packer L. Academic press. New York 53:382-292, 1978
26. Aebi H. Catalase in methods of enzymatic analysis, Berbmeyer HU, Bergmeyer J, Gra M. 3rd ed. Verlag chemie 3:273-286, 1983
27. Flohe L, Wolfgang A, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. In Methods in Enzymol, Packer L ed, New York Academic Press 105:14-121, 1984
28. Park PS, Koh CN, Park JY. Effects of total dietry restrictionon the contents of thiobarbituric acid-reactive substance and antioxidant enzymes in the liver and kidney of rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 28:471-476, 1999
39. Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A. Effect of dietary restriction onthe age dependent changes in the expression of antioxidant enzyme in rat liver. J Nutr 120:602-609, 1990
30. Xia E, Rao G, Van RH, Heydari AR, Richardson A. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. J Nutr 125:195-201, 1995
31. Lammi-Keefe CJ, Swan PB, Hegarty PV. Effect of level of dietary protein and total or partial starvation on catalase and superoxide dismutase activity in cardiac and skeletal muscles in young rats. J Nutr 114:2235-2240, 1984

32. Matkovics B, Varga SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. Horm Metab Res 14:77, 1982
33. Gruno Hagglof, Stefan I, Marklund, Gosta H. Cu Zn superoxide diamutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocyte and erythrovytes in insulin dependent diabetic children. Acta Endocrinologica 102:235, 1983
34. Saleh A, Wohaieb, David V, Godin. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in stretozocin induced diabetes in rat. Diabetes 36:1014, 1987