

당뇨 유발 백서에서의 심근손상에 대한 항산화제 효과

관동대학교 의과대학 순환기내과학교실,¹ 건국대학교 의과대학 내과학교실,² 한림대학교 의과대학 내과학교실³
 고종훈¹ · 유규형² · 임성희³ · 홍경순³ · 최영진³ · 박성우³

Effect of Antioxidants on Myocardial Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Jong Hoon Koh, MD¹, Kyu Hyung Ryu, MD², Sung Hee Lim, MD³,
 Kyung Soon Hong, MD³, Yung Jin Choi, MD³ and Sung Woo Park, MD³

¹Department of Cardiology, Kwandong University College of Medicine, Goyang.

²Department of Cardiology, Konkuk University Collage of Medicine, Seoul.

³Department of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, Anyang, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Many diabetic patients suffer from cardiomyopathy, even in the absence of vascular disease. The aim of this study was to see if dietary antioxidant supplementation has an inhibitory effect on the progression of cardiac tissue damage in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Materials and Methods :** Sprague-Dawley male rats (n=60) were used as experimental animals; they were divided into the normal control group and the diabetic group. Eight weeks after STZ injection (65 mg/kg of body weight), the products of lipid peroxidation (malondialdehydes, MDA), and the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), and catalase activities were determined in the cardiac tissue homogenates. The cardiac tissues were studied by light microscopy (LM) and electron microscopy (EM), and the tissue lesions were graded by a semiquantitative score. **Results :** The histologic scores for perivascular fibrosis, interstitial fibrosis and myocardial necrosis according to LM were significantly lower in the combined vitamin C & E treated rats than in the diabetic control rats. The ultrastructural scores for the overall cardiac morphology, mitochondria and myofilaments, according to EM, were significantly lower in the vitamin E treated rats and the combined vitamin C & E treated rats than in the diabetic control rats, even though this was of less magnitude than that in the insulin-treated diabetic rats. **Conclusion :** These results suggest that antioxidants such as vitamin C & E might have a beneficial effect on diabetes as an adjunct therapy against lipid peroxidation and diabetic cardiomyopathy, in addition to the effects of instituting strict measures for controlling the blood glucose. (Korean Circulation J 2006;36:261-271)

KEY WORDS : Antioxidants ; Experimental diabetes mellitus.

서 론

당뇨병의 합병증은 대부분 지질대사 이상이나 동맥경화에 의한 이차적 변화로 생각되지만 심장판막 질환, 고혈압, 관상동맥 질환 없이도 발생하는 당뇨병성 심근증은 당뇨 환자

의 율혈성 심부전의 주된 원인으로 생각되어 지고 있다.¹⁾ 이 당뇨병성 심근증은 간질성 섬유화와 전반적 심근의 변성과 함께 심근 수축 단백질의 상태를 반영하는 myofibrillar ATPase 가 감소하는 것으로 보고되었다.²⁾ 요즘 당뇨병 만성합병증에 대한 연구는 내적 및 외적으로 증가되는 자유 라디칼에 의한 산화 스트레스가 합병증의 발생 경로일 가능성이 활발히 연구되고 있다.³⁾

In vitro 연구에서 고혈당에 의한 연속적인 당화 반응 및 단백질의 당화적 산화 등에 의해 단백질과 교차 결합된 복합체인 최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)이 혈관 내피세포 수용체에 결합하여 malondialdehyde(MDA)

논문접수일 : 2005년 11월 3일

수정논문접수일 : 2006년 1월 11일

심사완료일 : 2006년 2월 20일

교신저자 : 고종훈, 412-270 경기도 고양시 덕양구 화정동 697-24

관동대학교 의과대학 순환기내과학교실

전화 : (031) 810-6770 · 전송 : (031) 810-6778

E-mail : heartkoh@kwandong.ac.kr

기가 나타나 산화 스트레스를 증가시키고 비효소적 당화와 자가산화적 당화의 증가가 당뇨병에서 산화 스트레스가 증가 되는 중요한 기전으로 이것이 당뇨병의 합병증 발생에 중요한 역할을 할 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 당뇨병성 심근병증의 유발에도 활성 산소종이 중요한 역할을 하고 특히 심장은 유리 라디칼 제거제(scavenger)의 낮은 농도로 인해 산화적 손상에 예민하다고 보고 되고 있다.⁵⁾

당뇨병 합병증은 증가된 산화 스트레스에 기인한다는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 그러나 당뇨병의 동물 모델 및 일부 임상 연구에서 당뇨병의 만성 합병증 발생 이전에도 산화 스트레스가 증가된다는 관찰들에 기초하여 증가된 산화 스트레스에 의해 유발된 조직의 변화가 당뇨병 만성 합병증의 여러 발생 기전들의 공통된 경로라는 'prooxidant consensus'가 이루어져 산화 스트레스의 역할에 관하여 활발히 연구되고 있다.⁶⁾

당뇨병에서 증가된 산화 스트레스가 산화 손상 및 합병증 발생에 중요한 기전이라면 당뇨병 환자에게도 항산화제 투여로 산화 손상을 막음으로써 당뇨병의 합병증이 예방되거나 진행이 지연될 가능성이 있다. 따라서, 당뇨병 만성 합병증의 예방 및 치료에서 항산화제의 역할에 최근 관심이 모아지고 있다.⁷⁾ 관상동맥질환 환자에서 베타 카로틴, 비타민 C, 비타민 E 등 항산화제 투여로 항산화효소의 활성도를 증가시키고 지질 산화를 방지하여 동맥경화를 예방하는 효과가 있었음이 보고 하였다.⁸⁾ 당뇨병 환자를 대상으로 한 소규모의 단기간 연구들에서도 비타민 E, 비타민 C, 프로부콜, 글루타치온 등의 항산화제 투여로 저밀도 지단백의 산화나 혈장 지질 과산화물, 혈소판 응집 등이 감소된다고 보고 되고 있다.⁹⁾ 또한 고혈압 환자뿐만 아니라 당뇨병 환자에서도 비타민 C를 투여시 전완의 내피의존성 혈관 확장을 의미 있게 개선되어 죽상경화증의 초기 변화인 내피기능부전이 항산화제에 의해 호전될 수 있음을 보고하였다.¹⁰⁾¹¹⁾

죽상경화증 뿐만 아니라 당뇨병 백서에서 프로부콜의 투여나 항산화제인 N-acetyl-cysteine 투여로 고혈당에 의한 심근세포의 괴사 및 고사(apoptosis)와 이에 따른 보상적 비후를 막을 수 있고¹²⁾¹³⁾ 또한 심근세포에 metallothionein이나 catalase와 같은 항산화단백을 과발현시킨 동물 모델에서 당뇨병성 심근손상이 예방된다고 보고 되고 있다.¹⁴⁾¹⁵⁾

본 연구에서는 널리 이용되고 있는 항산화제의 투여가 당뇨병에서 *in vivo*의 산화 스트레스 및 지질 과산화를 억제하고 당뇨병에서 관찰되는 심근 조직의 손상을 지연 또는 억제할 수 있는지 알아보고자 streptozotocin(STZ)으로 당뇨병을 유발한 백서에 항산화제인 비타민 C와 비타민 E를 8주간 투여한 후 조직의 지질 과산화물 및 항산화효소 활성도를 측정하였고 심장조직의 섬유화 정도 및 심근 괴사 정도 및 심근세포의 미세 구조적 형태 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 동물 관리 및 시료 채취

본 실험에 사용한 실험 동물은 체중 120 ± 10 g의 Sprague-Dawley 수컷 백서로서 약 4주간 환경에 적응시키기 위해 예비 사육한 후 건강한 동물만을 선택하여 60마리를 실험에 사용하였다. 사육실의 환경은 실내 온도 $20 \sim 22^\circ\text{C}$, 명암 주기 12시간 cycle(light 6 : 00~18 : 00)로 유지하였다.

각 군의 평균 체중이 비슷하도록 임의로 나눈 후 당뇨병을 유발하지 않은 '정상 대조군' 과 당뇨병을 유발한 '당뇨병 대조군', '비타민 C 투여 당뇨군', '비타민 E 투여 당뇨군', '비타민 C와 비타민 E를 병용 투여한 '비타민 C/E 투여 당뇨군', 그리고 인슐린을 투여한 '인슐린 투여 당뇨군'의 6군으로 분류하여 8주간 사육하였다.

당뇨병 유발은 인슐린 의존성 당뇨병과 유사한 실험 모델을 만들기 위해 streptozotocin(STZ)을 사용하였고, 정상 대조군 10마리를 제외한 50마리의 백서에 0.1 M의 sodium citrate buffer(pH 4.5)에 녹인 STZ을 체중당 65 mg씩 되도록 꼬리 정맥에 주사하였다.

STZ 주사 후 3일째 꼬리정맥에서 정맥혈을 취하여 Glucometer로 혈당치를 측정하여 300 mg/dL 이상인 경우에 당뇨병이 유발된 것으로 판정하였다. 당뇨병 발생을 확인한 후 '당뇨병 대조군'은 고형사료와 물만 먹었고, '비타민 C 투여 당뇨군'은 비타민 C를 마시는 물에 1 g/L의 농도로 섞어주어 비타민 C의 섭취량이 400~600 mg/kg/day가 되도록 하였다. '비타민 E 투여 당뇨군'에게는 비타민 E(*dl-alpha-tocopherol*)를 400 mg/kg/day가 되도록 크립치즈와 사료를 혼합한 압착사료 형태로 투여하였다. '비타민 C/E 투여 당뇨군'에게는 비타민 C와 비타민 E 모두를 위와 동일한 방법으로 투여하였다. '인슐린 투여 당뇨군'에게는 녹십자사의 프로타판 비프-주 인슐린(40 U/cc)을 매일 0.1 cc(4 U)씩 매일 아침에 피하주사하였다.

실험 동물로부터 생체시료의 준비

STZ으로 당뇨병 유발 8주 후 실험 동물의 몸무게를 측정하고 ether 마취 하에서 개복하여 복부 대동맥에서 채혈하여 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈당, 인슐린, 콜레스테롤 및 중성지방 측정을 위한 혈장과 혈청을 얻었다. 재빨리 심장 및 간을 적출하여 생리 식염수로 씻어내고 지질 과산화물과 항산화효소 활성 측정을 위해 조직의 일부를 액체 질소로 급속 동결시켜 -80°C 에 보관하였다. 적출된 심장의 좌심실 일부는 광학현미경과 전자현미경에 의한 형태학적 분석을 위해 고정액에 고정하였다.

혈당, 혈장 인슐린, 총 콜레스테롤 및 중성지방의 측정

혈청 포도당 농도는 glucose oxidase 방법(Beckman Coul-

ter Inc., Fullerton, CA, USA)으로 측정하였고, 혈장 인슐린 농도는 Abbott 사(Abbott Park, IL, USA)의 Insulin RIA BEAD II kit를 이용하여 방사면역측정법으로 측정을 하였다. 혈장 총 콜레스테롤과 중성지방(triglyceride)은 효소 반응을 이용한 kit(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 측정하였다.

조직의 지질 과산화물 및 항산화효소 활성 측정

지질과산화 정도의 지표인 Malondialdehyde(MDA)는 thiobarbituric acid(TBA)를 사용하는¹⁶⁾ 방법으로 측정하였으며, 단위는 조직 1 g당 MDA의 nmol로 표시 하였다. 조직을 homogenizer를 이용하여 1.15 M KCl에 10%(w/v)가 되도록 균질화한 후 4℃, 600 g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 일부는 Lowry 방법을 이용하여 단백질 함량을 결정하는데 사용하였다. 2 mL의 분석혼합물이 14 mM sodium dodecyl sulfate, 1.25 M acetic acid, 21 mM TBA, 그리고 500~600 ug의 단백질에 해당하는 조직균질액을 포함 하도록 하였다. 95℃에서 60분간 가열 후 흐르는 물로 냉각 시키고, 0.5 mL의 증류수와 2.5 mL의 n-butanol/pyridine (15 : 1, v/v)을 가하여 잘 섞은 후 4000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 윗층에서 532 nm에서의 흡광도를 측정한 후 $\epsilon_M = 1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ 을 이용하여 MDA의 농도를 결정하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성의 측정은 알카리 상태에서 pyrogallol의 자가산화(autooxidation)에 의한 발색을 이용한¹⁷⁾ 방법에 의해 측정하였다. 즉 각각의 심장 조직과 간 조직 100 mg을 15 mL tube에 분취하고 hemogenization solution(0.32 M sucrose, 0.1 mM EDTA, pH 7.0) 1 mL에 넣고 polytron homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 얼음에서

10초씩 3번 반복하여 초음파 분쇄(Sonic dismembrator 550, Fisher Scientific)를 하였다. 1%(vol/vol) Tween 80, 0.05 M potassium phosphate(pH 7.0) 완충용액을 사용하여 다시 10배 희석하였다. 이 조직균질액에 0.4 부피의 ethanol/chloroform(25 : 15, vol : vol)을 첨가하고 진탕한 후 4℃, 5,000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 0.5 의 0.01 M HCl에 20 mM pyrogallol을 5 uL 가해 200 uM의 농도로 만든 후 초기 420 nm에서 흡광도(A₄₂₀)를 측정하였으며, 바로 일정량의 시료용액을 가한 후 2분 뒤 다시 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선을 위해서는 양을 달리하는 SOD를 가한 후 동일한 조건에서 흡광도를 측정하였다. 심장의 경우 조직균질액 250 uL를, 간조직은 조직균질액 50 uL를 사용하여 흡광도의 변화를 관찰하였다. 효소 활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제 하는 효소의 양으로 정하였다.

Catalase 활성도는¹⁸⁾ 기질인 H₂O₂ 용액에 조직균질액을 가하여 25℃에서 반응시켜 240 nm에서 소실되는 H₂O₂의 양을 측정하였다. 즉, 위 조직균질액을 phosphate buffer로 100배 희석한 후, 50 uM phosphate buffer(pH 7.0) 2.0 uL에 조직균질액 0.02 uL와 10 mM H₂O₂ 용액 1.0 mL을 넣은 후 240 nm에서 30초간 변화되는 흡광도를 측정하였다. 단위는 조직 1 mg당 unit으로 표시 하였고, 1분당 1 uM의 H₂O₂를 분해 시킬 수 있는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

심장 조직의 형태적 분석

광학 현미경상 분석은 쥐의 좌심실벽을 10%의 중성 포르말린에 고정하고 파라핀 포매 후 5 um 두께로 박편 후 Hematoxylin과 Eosin(H & E) 염색과 Masson's trichrome(MT)

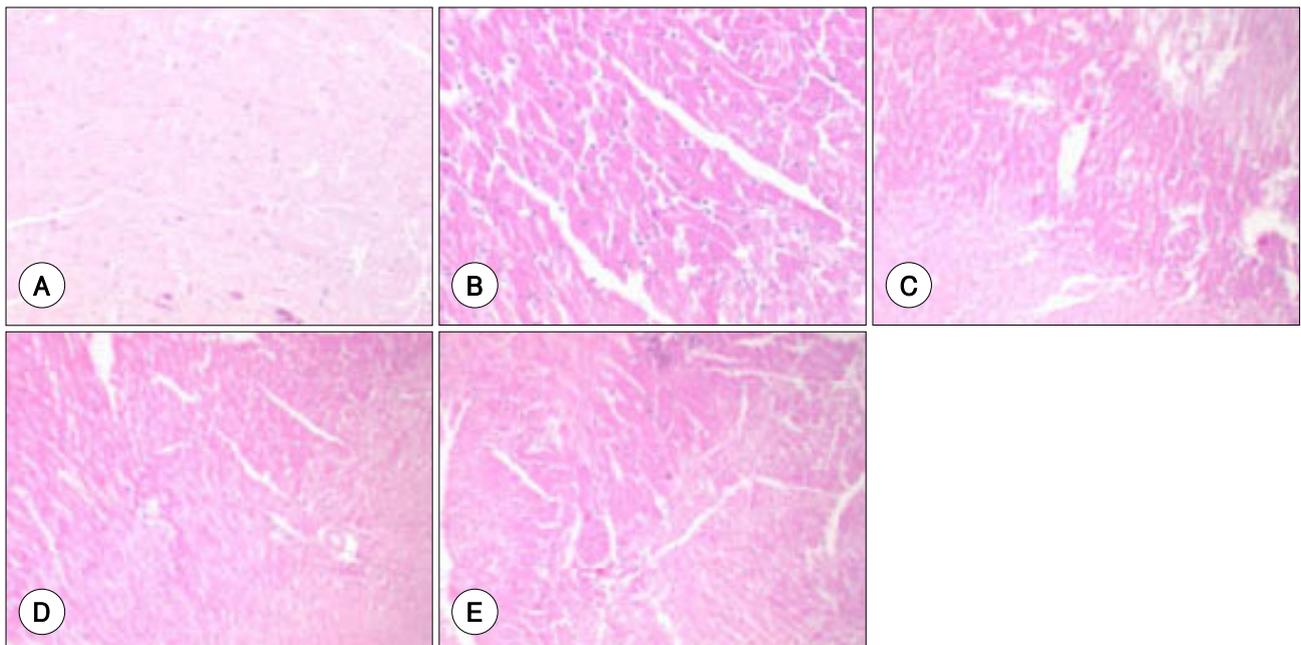


Fig. 1. Grading on based on the extent of myocardial necrosis. A: 0: questionable. B: 1: minimal (less than 25%). C: 2: mild (less than 50%). D: 3: moderate (less than 75%). E: 4: severe (more than 75% (H & E stain × 150)).

염색을 시행하였다. 두 명의 판독자가 H & E 염색한 슬라이드(3장/마리)를 검색하여 심근세포의 괴사/공포성 변화 및 간질 내 염증세포의 침윤, 즉 cellularity 증가를 분석하였다.

심근세포의 괴사 정도는 Akula 등¹⁹⁾의 조직학적 분석 방법으로 H & E 염색의 150배 비율에서 4등분하여 거의 없는(5% 미만) 경우 0점, 25% 미만의 괴사인 경우(1점), 50% 미만의 괴사가 있는 경우(2점), 75% 미만의 괴사가 있는 경우는(3점), 75% 이상의 괴사가 있는 경우(4점)로 정량화하여 각 군간 평균하여 비교하였다(Fig. 1).

전자 현미경상 분석은 쥐의 좌심실벽을 1 mm 두께로 박편한 조직을 2.5% glutaraldehyde로 1차 고정하고 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 세척 후 1% OsO₄로 2차 고정하고 통상의 Luft방법대로 세척하고 건조시킨 후 Epon 혼합액에 포매하였다. 심실 부위를 100~120 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색을 시행한 후 전자현미경으로 심근 조직의 초미세적 구조(ultrastructure)의 형태학적 변화를 관찰하였다.

초미세적 구조의 분석은 심장 조직의 형태학적 변화를 Liang 등¹⁴⁾의 방법으로 1에서 4로 등급을 정하여 정량하였다. 동일한 배율로 좌심실 초박편의 전자현미경 소견을 인쇄(4장/마리)하여 두 명의 판독자가 형태적 변화가 전혀 없는 경우 1점, 약간의 형태적 변화가 있는 경우 2점, 중등도의 형태적 변화가 있는 경우 3점, 심한 형태적 변화가 있는 경우 4점으로 등급을 정하였다. 전체적 형태(overall morphology) 변화는 심장 조직의 부종 정도, myelin 형태, 전체적 구조(overall organization)로 평가하였고, 미토콘드리아의 형태(mitochondrial morphology) 변화는 미토콘드리아의 packing, 밀도 및 형태에 따라 평가하였고, 심근섬유의 형태(myofilament morphology) 변화는 Z line의 선형(linearity), 심근섬유의 규칙성과 연속성에 따라 평가하였고, 각 군의 점수를 평균하여 비교 분석하였다.

통계 처리

실험 결과의 수치는 평균±표준 편차(mean±standard deviation)로 표시하였고, 결과의 유의성 여부는 Student's t-test 분석을 이용하였다. 통계적 유의 수준은 p<0.05로 하였다.

결 과

STZ 투여 후 8주 동안 실험군 중 폐사한 동물이 있어, '정상 대조군' 10마리, '당뇨병 대조군' 8마리, '비타민 C 투여 당뇨군' 9마리, '비타민 E 투여 당뇨군' 9마리, '비타민 C/E 투여 당뇨군' 10마리, 그리고 '인슐린 투여 당뇨군' 10마리로 실험하였다.

체중의 변화

STZ 투여 8주 후의 체중은 '정상 대조군'과 '인슐린 투여 당뇨군'에서 STZ 투여 전보다 각각 122±10 g, 105±14 g

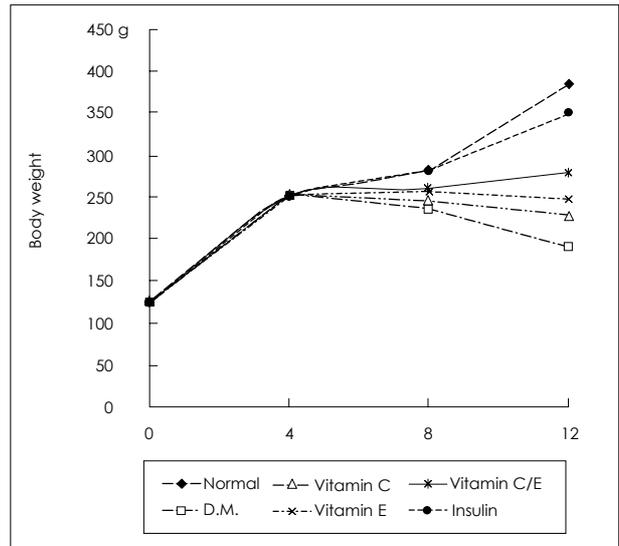


Fig. 2. Change of body weight in rats during the experiment. The body weights of diabetic rats were significantly reduced and vitamin C and E treated rats were significant increased after 12 weeks. D.M: diabetic melitus (diabetic control group).

Table 1. Level of plasma glucose, insulin, cholesterol, triglyceride in STZ-induced diabetic rats

	Glucose (mg/dL)	Insulin (uU/mL)	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)
Normal	159 ± 10	21.2 ± 1.2	73.3 ± 5.7	86.5 ± 5.4
D.M	456 ± 39	14.7 ± 1.4	122.4 ± 4.5	137.3 ± 5.5
Vit C	434 ± 24	15.6 ± 0.9	119.2 ± 4.8	132.8 ± 5.6
Vit E	439 ± 33	15.4 ± 1.1	117.4 ± 5.6	128.2 ± 4.5
Vit C+E	429 ± 34	15.8 ± 1.3	114.9 ± 3.7*	127.6 ± 5.6*
Insulin	175 ± 25*	20.1 ± 1.4*	76.5 ± 5.7*	93.5 ± 1.8*

All values are means ± SD. *: p<0.05 vs. D.M rats. D.M: diabetic melitus (diabetic control group), STZ-induced: streptozotocin induced

씩 증가되었다. '당뇨병 대조군'은 STZ 투여 전에 비해 62±15 g 체중이 감소되었고, '비타민 C 투여 당뇨군'과 '비타민 E 투여 당뇨군'도 각각 46±19 g, 43±21 g씩 체중이 감소되었다. '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 23±21 g의 약간의 체중 증가가 있었다(Fig. 2).

혈당 및 혈장 인슐린의 변화 중 콜레스테롤 중성지방 농도 변화

STZ 투여 8주 후의 혈청 포도당 농도는 '당뇨병 대조군'에서 '정상 대조군'보다 약 3배 높았고, '비타민 C 투여 당뇨군'이나 '비타민 E 투여 당뇨군', '비타민 C/E 투여 당뇨군' 모두 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의한 혈당의 차이는 관찰되지 않았다. '인슐린 투여 당뇨군'의 혈당은 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았다(p=0.0001).

혈장 인슐린 농도는 '당뇨병 대조군'에서 '정상 대조군'보다 현저하게 낮았고(p=0.001), '비타민 C 투여 당뇨군'이나 '비타민 E 투여 당뇨군', '비타민 C/E 투여 당뇨군' 모두 '당뇨병 대조군'과 혈장 인슐린 농도에 유의한 차이는 없었다. '인슐린 투여 당뇨군'의 혈장 인슐린 농도는 '당뇨병

대조군'에 비하여 유의하게 높았다($p=0.0001$)(Table 1).

STZ 투여 8주 후의 혈장 총 콜레스테롤 농도와 중성지방 농도는 '당뇨병 대조군'에서 '정상 대조군'보다 유의하게 높았다($p<0.01$). '비타민 C 투여 당뇨군'이나 '비타민 E 투여 당뇨군'에서는 '당뇨병 대조군'에 비해 유의한 차이가 없었으나, '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 '당뇨병 대조군'에 비해 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). '인슐린 투여 당뇨군'의 혈장 총 콜레스테롤 농도와 중성지방의 농도는 '당뇨병 대조군'에 비해 현저한 감소를 보였다($p=0.0001$)(Table 1).

산화효소 활성도

STZ 투여 8주 후 심장 조직의 MDA 농도는 '당뇨병 대조군'에서 32.1 ± 3.4 nmol/g으로 '정상 대조군'의 12.9 ± 3.1 nmol/g보다 유의하게 높았다($p=0.001$). '비타민 C 투여 당뇨군'은 28.6 ± 4.2 nmol/g, '비타민 E 투여 당뇨군'은 28.2 ± 4.2 nmol/g으로 양 군 모두에서 '당뇨병 대조군'과 유의한 차이를 보이지 않았으나, '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 27.6 ± 4.8 nmol/g, '인슐린 투여 당뇨군'에서는 19.6 ± 4.6 nmol/g으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았다(각각 $p<0.05$, $p<0.01$)(Fig. 3).

조직의 Superoxide Dismutase(SOD) 및 Catalase 활성도

STZ 투여 8주 후 심장 조직의 SOD 활성도는 '당뇨병 대조군'에서 2.07 ± 0.33 U/mg protein으로 '정상 대조군'의 1.39 ± 3.8 U/mg protein 보다 유의하게 높았다($p<0.01$). '비타민 C 투여 당뇨군'은 1.75 ± 0.36 U/mg protein, '비타민 E 투여 당뇨군'에서는 1.74 ± 0.32 U/mg protein으로 양 군 모두에서 '당뇨병 대조군'과 유의한 차이를 보이지 않았으나, '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 1.65 ± 0.43 U/mg protein, '인슐린 투여 당뇨군'에서는 1.59 ± 0.48 U/mg protein으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았다(각각 $p<0.05$, $p<0.01$).

STZ 투여 8주 후 심장 조직의 catalase 활성도는 '당뇨병 대조군'에서 43.6 ± 2.2 U/mg protein으로 '정상 대조군'의 22.5 ± 1.9 U/mg protein보다 유의하게 높았다($p=0.001$). '비타민 C 투여 당뇨군'은 38.5 ± 3.1 U/mg protein, '비타민 E 투여 당뇨군'은 군에서는 36.6 ± 0.8 U/mg protein으로 양 군 모두에서 '당뇨병 대조군'과 유의한 차이를 보이지 않았으나, '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 31.2 ± 2.4 U/mg protein, '인슐린 투여 당뇨군'에서는 27.6 ± 1.6 U/mg protein으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았다(각각 $p<0.05$, $p<0.01$)(Fig. 3).

심장 조직의 형태적 분석

광학 현미경상 분석

'당뇨병 대조군'은 '정상 대조군'에 비하여 혈관 주위에 교

원섬유의 현저한 증가와 혈관 주위 섬유화 소견이 관찰되었다. 또한 지방세포의 증가가 관찰되었고, 부분적으로 심근섬유의 크기 감소와 불규칙한 배열, 심근섬유 사이의 간질에 국소적 섬유성 결합조직의 침윤 양상과 부분적인 심근세포의 호산성 변화와 불규칙한 배열이 관찰되었다.

'비타민 C 투여 당뇨군'이나 '비타민 E 투여 당뇨군'은

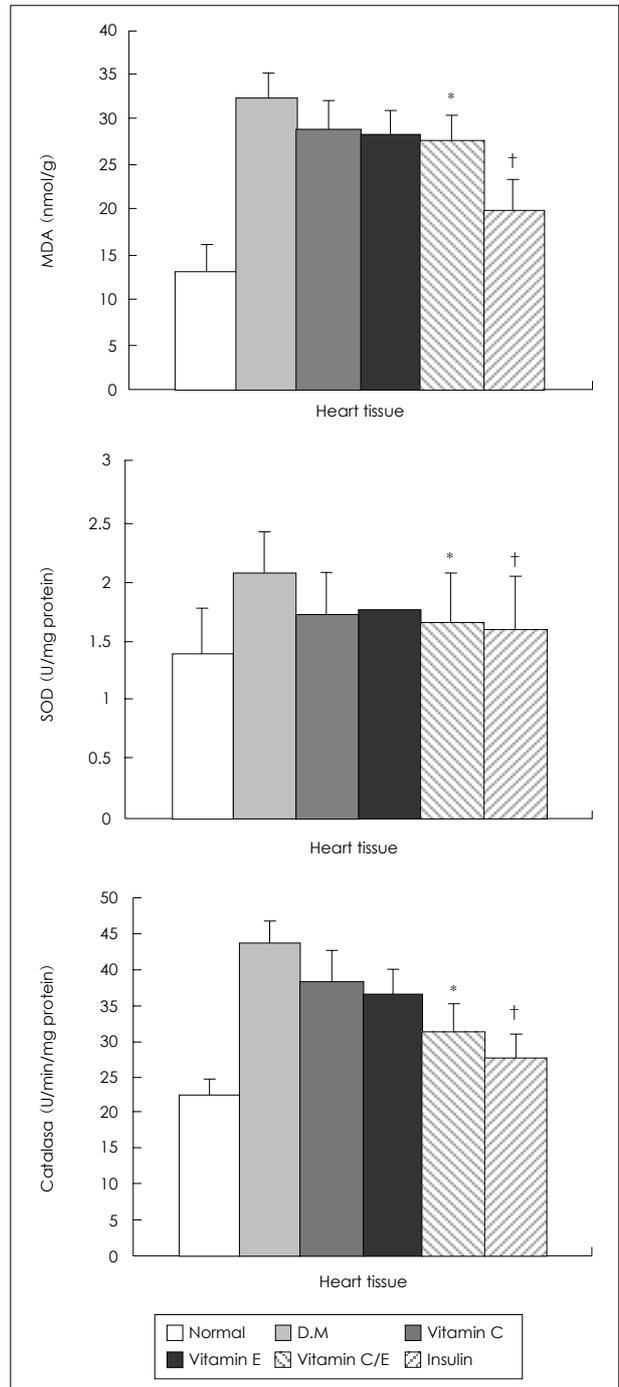


Fig. 3. Level of tissue MDA level, tissue SOD and Catalase activity in STZ-induced diabetic rats. *: $p<0.05$ vs. D.M rats, †: $p<0.01$ vs. D.M rats. MDA: malondialdehydes, SOD: superoxide dismutase, STZ-induced: streptozotocin induced, D.M: diabetic melitus (diabetic control group).

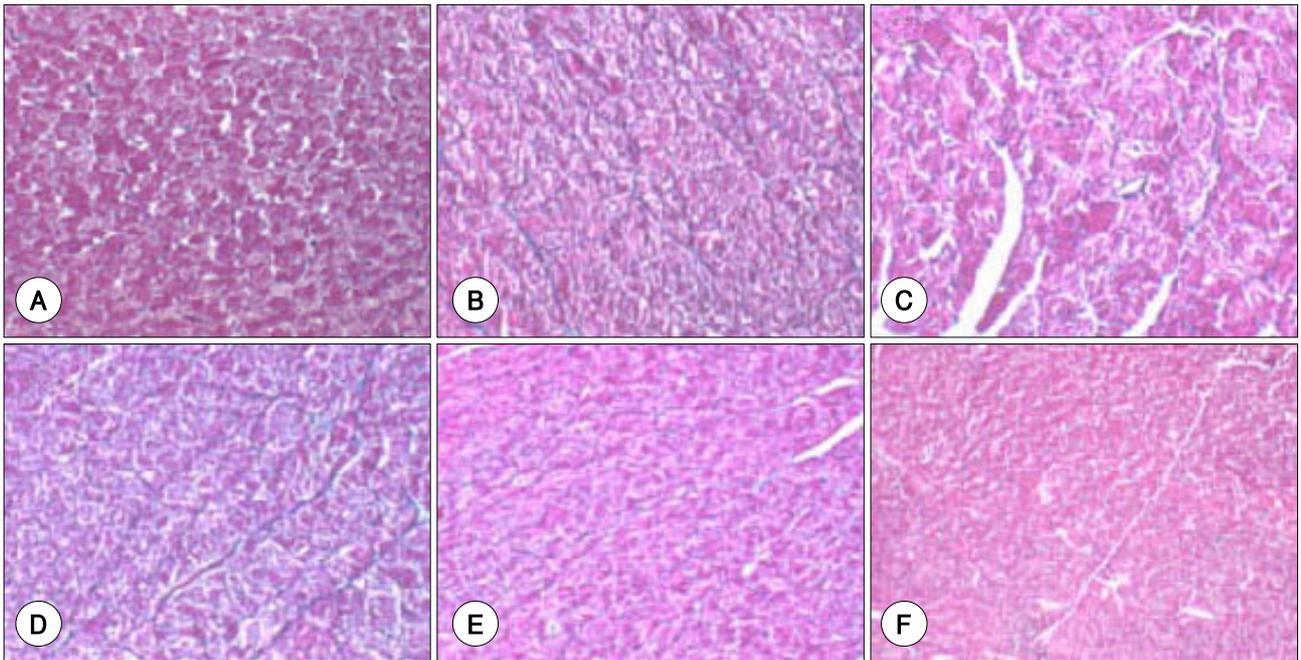


Fig. 4. Light microscopic findings from rat heart. A: normal control group. B: diabetic control group. C: vitamin C group. D: vitamin E group. E: vitamin C and E group. F: insulin group (Masson's trichrome stain $\times 300$).

'당뇨 대조군'에 비하여 혈관 주위의 교원섬유화와 심근섬유 사이의 간질에 국소적 섬유화 정도의 감소 소견이 거의 보이지 않았고, 오히려 비타민 C만을 투여한 '비타민 C 투여 당뇨군'에서는 심근 조직의 괴사는 더 심해진 경우도 보였다. 반면 '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 '당뇨병 대조군'에 비하여 혈관 주위의 교원섬유화 및 심근섬유 사이 간질의 국소적 섬유화의 유의한 감소를 보였으며 심근 조직의 괴사가 많이 감소된 소견이 관찰되었다. '인슐린 투여 당뇨군'에서는 혈관주위의 교원섬유화 및 심근섬유 사이 간질의 국소적 섬유화 및 심근조직의 괴사는 거의 보이지 않았다(Fig. 4).

심근 조직의 괴사 정도는 '당뇨병 대조군'에서 3.6 ± 0.6 점으로 '정상 대조군'의 0.2 ± 0.2 보다 유의하게 높았다($p < 0.001$). '비타민 C 투여 당뇨군'에서는 2.8 ± 0.4 점, '비타민 E 투여 당뇨군' 2.6 ± 0.5 점으로 양 군 모두 '당뇨병 대조군'과 유의한 차이가 없었다. '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 2.2 ± 0.5 점, '인슐린 투여 당뇨군'에서는 1.6 ± 0.5 점으로 양 군 모두 '당뇨병 대조군'에 비해 유의하게 낮았다(각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$).

하지만 '비타민 C/E 투여 당뇨군'과 '인슐린 투여 당뇨군'을 비교하여 보면 심근 조직의 괴사 정도는 '인슐린 투여 당뇨군'에서 유의하게 더 낮았다($p < 0.05$).

전자 현미경상 분석(Fig. 5)

'정상 대조군'에서의 심근세포 전자현미경소견은 근원섬유(myofibril)가 진하고 뭉쳐져 있고 sarcoplasmic reticulum과 T-tubules들이 비교적 잘 정돈되어 있고 그 양쪽 사이의 미토콘드리아에 손상이 없었다. 이에 비하여 '당뇨병 대조군'의 심근세포는 근원섬유 및 Z-band를 구성하고 있는 많은 부위에서 sarcomere가 분실되고, 그 자리가 coalescent vacuoles을 가진 세포질로 채워져 있고 군데군데 지방 침착 등 심근세포의 변성이 확인되었고 미토콘드리아의 손상이 심하였다.

'당뇨병 대조군'에 비하여 '비타민 C 투여 당뇨군'에서는 심근세포의 sarcomere 분실의 감소나 coalescent vacuoles을 가진 세포질, 지방 침착 등의 심근세포의 변성의 감소가 유의하게 관찰되지 않았고 미토콘드리아의 손상도 여전히 심하였다. 반면 '비타민 E 투여 당뇨군'이나 특히 '비타민 C/E 투여 당뇨군'에서는 sarcomere의 분실 및 심근세포의 용해(myocytolysis) 등이 비교적 감소되었고 미토콘드리아의 손상도 많이 감소되어 있었다. '인슐린 투여 당뇨군'에서는 '정상 대조군'에서 볼 수 있었던 진하고 뭉쳐진 근원섬유와 비교적 잘 정돈되어 있는 sarcoplasmic reticulum과 T-tubules들이 대부분 관찰되었고 미토콘드리아의 손상도 거의 없었다.

심근세포의 미세적 구조의 총 형태적 변화 정도는 '당뇨병 대조군'에서 3.8 ± 0.5 점으로 '정상 대조군'의 1.1 ± 0.4 점에 비하여 유의하게 높았고($p < 0.001$), '비타민 C 투여 당뇨군'에서는 3.4 ± 0.5 점으로 '당뇨병 대조군'과 유의한 차이가 없었다. 그러나 '비타민 E 투여 당뇨군'은 3.0 ± 0.8 점으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 C/E 투여 당뇨군'은 2.3 ± 0.5 점으로 더 낮았다($p = 0.001$).

미토콘드리아의 형태적 변화 정도는 '당뇨병 대조군'에서 3.8 ± 0.5 점으로 '정상 대조군'의 1.1 ± 0.4 점에 비하여 유의하게 높았고($p = 0.001$), '비타민 C 투여 당뇨군'에서는 3.3 ± 0.5 점으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 E 투여 당뇨군'은 2.8 ± 0.4 점으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 C/E 투여 당뇨군'은 2.1 ± 0.4 점으로 더 낮았다($p = 0.001$).

미토콘드리아의 형태적 변화 정도는 '당뇨병 대조군'에서 3.8 ± 0.5 점으로 '정상 대조군'의 1.1 ± 0.4 점에 비하여 유의하게 높았고($p = 0.001$), '비타민 C 투여 당뇨군'에서는 3.3 ± 0.5 점으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 E 투여 당뇨군'은 2.8 ± 0.4 점으로 '당뇨병 대조군'에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 C/E 투여 당뇨군'은 2.1 ± 0.4 점으로 더 낮았다($p = 0.001$).

0.7점으로 '당뇨병 대조군' 과 유의한 차이가 없었다. 그러나 '비타민 E 투여 당뇨군' 은 2.9 ± 0.8 점으로 '당뇨병 대조군' 에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 C/E 투여 당뇨군' 은 2.1 ± 0.6 점으로 더 낮았다($p = 0.001$).

심근세포의 심근섬유 형태적 변화 정도는 '당뇨병 대조군' 에서 3.5 ± 0.6 점으로 '정상 대조군' 의 0.2 ± 0.2 점보다 유의하게 높았고($p = 0.001$), '비타민 C 투여 당뇨군' 에서는 3.3 ± 0.5 점으로 '당뇨병 대조군' 과 유의한 차이가 없었다. 그러나 '비타민 E 투여 당뇨군' 은 2.9 ± 0.6 점으로 '당뇨병 대조군' 에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$), '비타민 C/E 투여 당뇨군' 은 1.9 ± 0.4 점으로 더 낮았다($p = 0.001$).

'인슐린 투여 당뇨군' 의 심근세포의 미세적 구조의 총 형태적 변화 정도는 1.5 ± 0.5 점, 미토콘드리아의 형태적 변화 정도는 1.4 ± 0.5 점, 심근섬유의 형태적 변화 정도는 1.4 ± 0.5 점으로, '비타민 C/E 투여 당뇨군' 보다도 유의하게 낮았고($p < 0.05$) '정상 대조군' 과는 유의한 차이가 없었다(Fig. 6).

고 찰

본 연구에서는 항산화제의 투여가 당뇨병에서 *in vivo*의 산

화 스트레스를 억제하고 당뇨병에서 관찰되는 심근 조직의 손상을 지연 또는 억제할 수 있는지 알아보려고 STZ으로 당뇨병을 유발한 백서에 항산화제인 비타민 C와 비타민 E를 각각 혹은 같이 8주간 투여하였다. 당뇨병 유발 후 8주 동안 인슐린을 투여한 군에서는 체중의 증가가 있었으나 비타민 C나 E의 투여만으로는 체중 감소를 막을 수 없었다. 비타민 C와 E를 함께 투여한 군에서는 약간의 체중 증가가 관찰되었다. 그러나, STZ 투여 8주 후의 혈청 포도당 농도는 '비타민 C 투여 당뇨군' 이나 '비타민 E 투여 당뇨군', '비타민 C/E 투여 당뇨군' 모두 '당뇨병 대조군' 에 비하여 유의한 감소는 없었다. 혈장 인슐린 농도도 '비타민 C 투여 당뇨군' 이나 '비타민 E 투여 당뇨군', '비타민 C/E 투여 당뇨군' 모두 '당뇨병 대조군' 에 비하여 유의한 증가는 없었다. 이러한 결과는 비타민 C나 비타민 E를 인슐린 의존형 당뇨병 환자들에게 투여하였을 때 높아진 혈당이나 당화혈색소를 낮추는데 효과가 없다는 이전의 연구 결과와 일치한다.²⁰⁾

STZ 투여 8주 후의 혈장 총 콜레스테롤 농도와 중성지방 농도는 예상대로 '당뇨병 대조군' 에서 '정상 대조군' 보다 유의하게 높았다. 비타민 C나 E의 투여로는 혈중 지질 농도

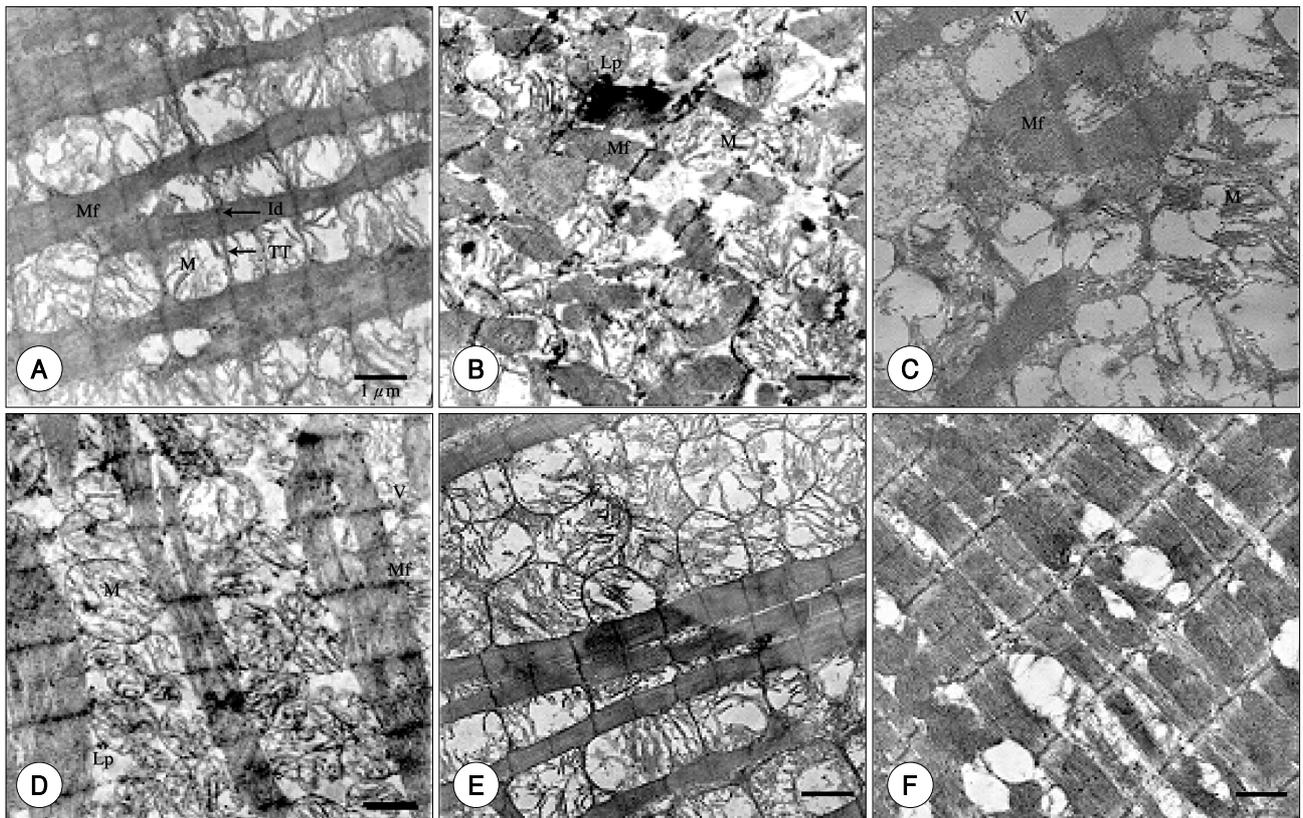


Fig. 5. Electron microscopic findings of myocytes. Normal control group. A: myofibrils (MF) are regular, densely packed and aligned, and mitochondria (M) are regularly arranged with continuous sarcomeres. Diabetic control group. B: randomly distributed mitochondria, poorly-organized myofibrils and loss of electron-dense staining and myelin formation. Lipid droplets (LP) associated with mitochondria. Vitamin C group (C) and Vitamin E group. D: decreased loss of integrity and disorganization and less damaged mitochondria compared with diabetic control group. Vitamin C/E group. E: significant reversal the myocytolysis with reformation and realignment of myofibrils and sarcomeres. Edematous mitochondria are decreased but misalignments are occasionally evident. Insulin group. F: relatively intact myofilaments and rare damaged mitochondria. Id: intercalated disk, TT: transverse tubule, V: vacuoles Calibration bar=1 um ($\times 16,000$).

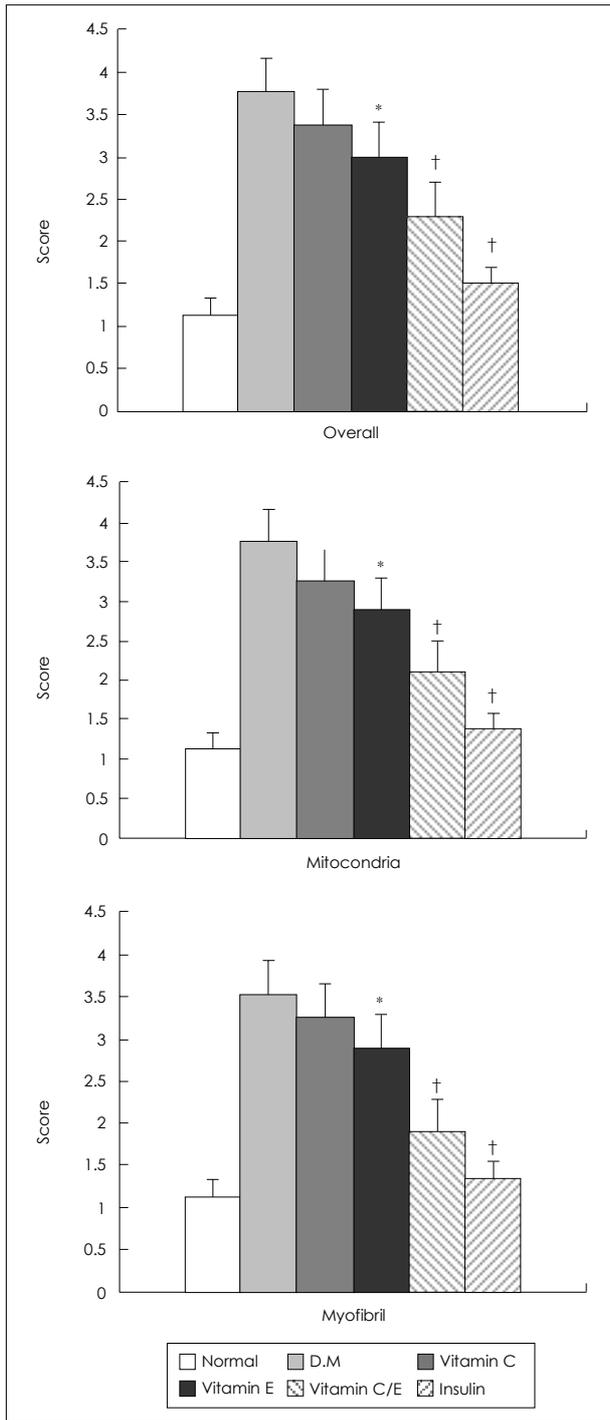


Fig. 6. Semi-quantification of cardiac morphology by electromicroscopy. Rating for overall morphology (A) mitochondria, (B) and myofibrils (C). *: $p < 0.05$ vs. D.M rats, †: $p < 0.01$ vs. D.M rats. D.M: diabetic melitus (diabetic control group).

의 유의한 감소는 관찰할 수 없었고, 비타민 C와 E를 함께 투여한 군에서도 p 값이 0.049로 통계적으로 유의하긴 하나 '인슐린 투여 당뇨군'에서와 같은 현저한 혈중 지질 농도의 감소는 관찰되지 않았다. 이전의 동물 실험이나 임상 연구들에서도 이들 항산화제를 각각 혹은 병용 투여시 지질 과산화의 감소가 관찰되는 용량들에서도 혈중 지질 강하효과

는 관찰되지 않았다.²¹⁾²²⁾

지질 과산화를 측정하는 방법들 중 가장 널리 이용되는 것은 TBA 방법으로 지질 과산화 과정의 마지막 산물인 MDA를 측정하는 것이다. 조직에서는 혈장과 달리 MDA 이외에 TBA와 비특이적으로 반응하는 물질의 양이 적어 신뢰할 수 있는 방법으로 이용되고 있다. 본 연구에서도 '당뇨병 대조군'에서 심장 및 간 조직의 MDA 반응도가 정상 대조군보다 유의하게 증가되어 있었다. 이렇게 당뇨병 상태에서 증가된 조직의 지질 과산화는 인슐린 투여로 현저히 감소시킬 수 없었으나, 비타민 C나 E의 투여만으로는 감소시킬 수 없었고 이의 병용 투여시 인슐린 투여군보다는 적게나마 유의하게 지질 과산화를 감소시킴이 관찰되었다.

당뇨유발 백서에서 여러 항산화효소들의 활성은 조직에 따라 증가 혹은 감소되는 것으로 보고 되어 왔는데²³⁾ 본 연구에서는 STZ 투여 8주 후 심장 조직의 SOD와 catalase 활성도 모두 '당뇨병 대조군'에서 '정상 대조군'에 비해 현저히 증가되어 있었다, 이는 이전의 연구들에서 STZ 유발 당뇨병 백서에서 심장 조직에서는 SOD와 catalase의 활성이 증가되고 간 조직에서는 SOD와 catalase의 활성이 감소되다는 연구 결과와 일치한다.

심장에는 항산화효소들의 활성이 간이나 신장에 비해 매우 낮다. 따라서 당뇨병 상태에서 원래 이들 활성이 낮은 심장 조직에서의 SOD나 catalase의 활성 증가는 산화적 스트레스에 대한 이 조직의 보상적 기전에 의한 것으로 해석된다. 특히 catalase의 활성 증가가 현저한데 이는 당뇨병에서 H₂O₂의 생성이 많아지고 이를 보상하기 위하여 활성이 증가된 것으로 보인다. 항산화효소의 발현은 산화 스트레스에 의해 전사수준에서 유도될 수 있다고 알려져 있다.

본 연구에서 항산화제 투여의 항산화효소에 대한 작용은 지질과산화물 측정 결과와 유사한 경향을 보였다. 즉, 당뇨병 상태에서 증가된 심장 조직의 SOD와 catalase 활성도는 인슐린 투여로 현저히 감소시킬 수 없었으나, 비타민 C나 E의 투여만으로는 감소시킬 수 없었고 이의 병용 투여시 인슐린 투여군보다는 적으나마 유의하게 SOD와 catalase 활성도를 감소시킴이 관찰되었다. 이는 백서에서 당뇨병이 유발되면 산화적 스트레스에 의한 조직 손상을 극복하기 위해 평소 항산화효소가 풍부하지 않은 심근 조직에서는 항산화 방어기전이 보상적으로 증가되어 있으며 또한 이러한 결과는 더 강력한 항산화작용을 얻기 위해서는 비타민 E나 비타민 C의 단독 투여보다는 병합요법이 필요함을 보여준다.

Haider 등²⁴⁾은 당뇨병의 심장 기능이상(cardiac dysfunction)은 심혈관의 변화와는 상관없이 일어난다고 보고하였다. 당뇨병성 심근병증의 원인은 인슐린의 결핍과 관련된 심근섬유의 대사 이상, 당화 반응이나 그 외 생화학적 이상으로 인한 간질 proteoglycan의 변화, 신경병증(neuropathy)으로 인한 이차적인 수축력의 변화, 모세혈관 투과성(permeability)에 영향을 주어 세포의 기능을 변화시키는 망막이나 신장에

서 볼 수 있는 것과 유사한 미세혈관병증(microvasculopathy)이 기여 요인으로 고려되어 왔다.²⁵⁾

Koltai 등²⁶⁾은 당뇨병성 심근병증은 병리조직학적 변화로는 결합조직이 간질과 혈관 주위에 증가하는 것과 세포사이의 matrix의 증가와 작은 동맥의 hyaline thickening, 심실 비대, 산재된 국소적 섬유화가 있다고 하였고, Regan 등²⁷⁾은 간질에 당단백, 중성지방과 콜레스테롤의 축적으로 PAS 양성 반응이 증가하고 만성 당뇨병성 심근의 구성과 기능이 변화된다고 하였다. Mirsky 등²⁸⁾은 혈관 주위와 심근세포 간질에 섬유성 단백질의 증가가 심근의 경직도와 관련이 있다고 보고하였고, Thompson 등²⁹⁾은 혈관 주위와 간질의 결합조직의 증가는 인슐린 치료로 대부분 회복된다고 하였다. Akula 등¹⁹⁾은 STZ으로 당뇨병을 유발한 백서에서 당뇨 유발 8주 후에는 심근 조직의 괴사가 심하지 않았지만 12주 이후에는 좌심실부전과 함께 광범위한 심한 심근 조직의 괴사가 생김을 보고하였고, Muruganandan 등²³⁾은 STZ으로 당뇨병을 유도한 백서에서 항산화작용을 갖고 있는 mangiferin을 투여한 백서에서 투여하지 않은 백서에 비해 심근 조직의 비후 및 심근세포의 섬유화와 혈관의 충혈, 내피 세포의 증식이 현저히 감소함을 보고하였다. 본 연구에서는 광학현미경 소견상 '당뇨병 대조군'에서 '정상 대조군'에 비해 심근세포의 배열이 매우 불규칙하고 호산성 세포질이 증가하고 심근세포 주위에 교원섬유의 현저한 증가가 관찰되었고, 비타민 E를 투여한 당뇨군과 비타민 C와 비타민 E를 같이 투여한 병용군에서는 교원섬유의 증가가 부분적으로 억제됨을 보였고 인슐린을 같이 투여한 군에서는 현저하게 감소되었다.

당뇨병이 유발되어 Reactive oxygen radical(ROS)의 생성이 증가되거나 항산화방어력이 저하되면 산화적 스트레스가 sarcolemma, sarcoplasmic reticulum의 손상, 미토콘드리아의 파괴, myofibril 손상을 초래하여 내피세포와 평활근세포에 독성을 보여 심근 세포를 괴사시킨다고 한다.²⁹⁾ 최근 당뇨병 모델 쥐에 항산화단백질인 metallothionein이나 catalase를 심장 조직에 과발현(overexpression)하도록 유전자를 조작하여 항산화기능을 증강시킨 유전자조작 쥐(transgenic mice)에서 심근 수축력이 회복되고 MDA농도가 현저히 감소되고 심근세포의 미토콘드리아의 구조적 손상이 회복되면서 심근조직이 정상화됨이 보고 되었다.¹⁴⁾¹⁵⁾ 이는 심장 조직에 항산화 방어계를 증강시키면 당뇨병에 의한 심장의 손상을 줄일 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 STZ으로 당뇨병을 유발한 백서에서 비타민 C 보다는 비타민 E를 투여했을 때 sarcoplasmic reticulum의 소실이나 myofibril 손상, 미토콘드리아 부종 또는 파괴, 공포화 등 심근 손상이 약간 감소하였고, 비타민 C와 비타민 E를 같이 투여했을 때 현저하게 myofibril 손상이 줄면서 Z line이 보존되고 미토콘드리아의 부종이나 파괴, 공포화가 많이 없어지면서 미토콘드리아는 정상인 심근세포가 많았다. 인슐린을 투여한 당뇨군은 sarcoplasmic reticulum의 손상,

미토콘드리아의 파괴, myofibril 손상은 거의 없었다. 본 연구에서 이러한 항산화제 투여군이나 인슐린 투여군에서의 전자현미경 소견의 변화는 심장 조직의 지질 과산화물이나 항산화효소 활성도의 측정 결과로부터 기대되는 소견이며, 당뇨병에서 항산화제 투여, 특히 비타민 C와 비타민 E의 병용 투여가 심근 조직에서 산화 스트레스를 줄임으로써 심장의 구조적 손상을 줄일 수 있음을 보여준다.

실험 동물에서의 본 연구의 결과는 비타민 C와 비타민 E와 같은 항산화제의 투여가 당뇨병에서 산화적 손상을 줄임으로써 당뇨병성 심근병증의 발생이나 진행을 지연시킬 가능성을 시사한다. 당뇨병 환자에서는 체내 산화적 스트레스가 증가하여 혈장내 존재하는 항산화제의 소모를 증가시켜 그 농도가 감소하여 항산화제인 비타민 C와 비타민 E, 베타-카로틴 농도 중 하나는 감소되어 있다는 보고들이 있다.³⁰⁾ 그러므로 본 연구의 결과는 당뇨병 환자에서 항산화제는 경구혈당강하제나 인슐린 투여에 의한 철저한 혈당 조절과 함께 보조적으로 만성합병증 예방을 위해 사용하는 것이 필요함을 뒷받침하며 앞으로 이를 검증하기 위한 임상 연구가 활발히 진행될 필요성이 있다. 본 연구에서는 인슐린 투여와 항산화제 투여를 병용한 군이 없어 인슐린을 투여한 당뇨군에서도 항산화제 투여가 부가적인 효과가 있을지는 연구되지 못하였다. 또한 당뇨병에서 항산화제 투여로 심장 기능에도 호전이 있는지 심초음파검사 등으로 향후 더 연구되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 STZ으로 유발된 당뇨병 백서에서 8주간 비타민 C와 비타민 E를 각각 혹은 병용 투여하여 병용 투여군에서 심장 조직에서 지질 과산화물이 감소되고 항산화효소 활성이 증가됨을 관찰하였고 광학현미경 및 전자현미경 소견으로도 비타민 E나 비타민 C와 비타민 E 병용 투여로 당뇨병에 의해 유발되는 심근 손상이 감소됨을 관찰하였다. 하지만 당뇨병성 심근병증을 비롯한 만성 합병증의 발생이나 진행을 지연시키는데 항산화제의 투여 용량, 투여 기간에 따른 효과 및 지질 과산화 이외의 다른 산화 스트레스 지표의 호전에 과연 유효할 것인지 등의 연구가 필요할 것으로 생각한다. 당뇨병환자에서 무분별한 항산화제의 사용은 예기치 않은 약물 상호작용이나 부작용을 유발할 수도 있으므로 이와 같은 연구들을 통하여 당뇨병에서 항산화제의 보조치료제로서의 역할 여부가 정립되어야 할 것이다.

요 약

배경 및 목적 :

당뇨병 환자들에서는 관상동맥질환과 같은 혈관질환이 없이도 당뇨병성 심근병증이 발생하고 이는 심부전과 사망의 원인이 되고 있다. 최근 동물 실험에서 당뇨병성 심근병증의 유발에 산화 스트레스가 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 널리 이용되고 있는 항산화제의 투여가 당뇨

병에서 *in vivo*의 산화 스트레스 및 지질 과산화를 억제하고 당뇨병에서 관찰되는 심근 조직의 손상을 지연 또는 억제할 수 있는지 알아보고자 하였다.

방 법 :

Streptozotocin(STZ)으로 당뇨병을 유발한 백서에 잘 알려진 항산화제인 비타민 C와 비타민 E를 각각 또는 병용하여 8주간 투여한 후 심장조직에서 산화 스트레스의 지표로서 지질 과산화산물인 MDA의 양, 방어기전인 항산화효소 SOD와 catalase의 활성도를 측정하였고 심장 조직의 섬유화 정도 및 심근괴사 정도를 광학현미경으로 관찰하고 전자 현미경으로 심근세포의 미세구조적 형태 변화를 관찰하여, 당뇨병 대조군 및 인슐린 투여 당뇨병군과 비교하였다.

결 과 :

STZ 투여 8주 후의 혈청 포도당과 혈장 인슐린 농도는 비타민 C와 E의 단독 혹은 병용 투여군에서 당뇨병 대조군과 유의한 차이가 없었고, 혈장 콜레스테롤과 중성지방의 농도는 병용 투여군에서 경미한 감소가 관찰되었다. 당뇨병 대조군에서 증가된 심장 조직의 지질 과산화물(MDA)은 인슐린 투여로 현저히 감소시킬 수 있었으나 비타민 C나 E의 단독 투여만으로는 감소시킬 수 없었고 병용 투여시 인슐린 투여군보다는 적으나 유의하게 감소되었다. 당뇨병 대조군에서 증가된 심장 조직의 SOD와 catalase활성도는 인슐린 투여로 현저히 감소시킬 수 있었으나 비타민 C나 E의 단독 투여만으로는 감소시킬 수 없었고 병용 투여시 인슐린 투여군보다는 적으나 유의하게 감소되었다. 심장 조직의 광학현미경 소견상 당뇨병 대조군에서 정상 백서에 비해 심근세포의 배열이 매우 불규칙하고 심근세포 주위에 교원섬유의 현저한 증가가 관찰되었고 인슐린 투여 당뇨병군에서는 이러한 변화가 현저하게 감소되었고 비타민 E 투여 당뇨병군과 비타민 C와 E를 병용 투여한 당뇨병군에서는 교원섬유의 증가가 부분적으로 억제됨이 관찰되었다. 전자현미경 소견에서도 비타민 E 투여 당뇨병군에서 sarcoplasmic reticulum의 소실이나 myofibril 손상, 미토콘드리아 부종 또는 파괴, 공포화 등 심근손상이 약간 감소하였고, 비타민 C와 E를 병용 투여한 당뇨병군에서는 현저하게 myofibril 손상이 줄면서 Z line이 보존되고 미토콘드리아가 정상인 심근세포가 많았고 인슐린 투여 당뇨병군은 sarcoplasmic reticulum의 손상, 미토콘드리아의 파괴, myofibril 손상은 거의 없었다.

결 론 :

본 연구에서는 STZ으로 유발된 당뇨병 백서에서 8주간 비타민 C와 비타민 E를 각각 혹은 병용 투여하여 병용 투여군에서 인슐린 투여군보다는 미약하나마 심장 조직의 지질 과산화물이 감소되고 항산화효소 활성이 증가됨을 관찰하였고 광학현미경 및 전자현미경 소견으로도 비타민 E나 비타민 C와 비타민 E 병용 투여로 당뇨병에 의해 유발되는 심근 손상이 감소됨을 관찰하였다. 앞으로 당뇨병성 심근병증을 비롯한 만성 합병증의 발생이나 진행을 지연시키는

데 효과적인 항산화제의 투여 용량, 투여 기간에 따른 효과 및 지질 과산화 이외의 다른 산화 스트레스 지표의 호전에도 유효한가 등의 연구가 필요하며 이와 같은 연구들을 통하여 당뇨병에서 항산화제의 보조치료제로서의 역할 여부가 정립되어야 할 것이다.

중심 단어 : 항산화제 ; 당뇨병발백서.

REFERENCES

- Shapiro LM, Leatherdale BA, Coyne ME, Fletcher RF, Mackinnon J. *Prospective study of heart disease in untreated maturity onset diabetics.* *Br Heart J* 1980;44:342-8.
- Ryu WS, Ryoo UH, Seo JD, Lee YW. *A study on the cardiac myofibrillar ATPase activity in Diabetic rats.* *Korean Circ J* 1987;17:479-90.
- Scott JA, King GL. *Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes.* *Ann NY Acad Sci* 2004;1031:204-13.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, et al. *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycosylation end products with their receptors/binding proteins.* *J Biol Chem* 1994;269:9889-97.
- Gonzalez-Vilchez F, Ayuela J, Ares M, Pi J, Castillo L, Martin-Duran R. *Oxidative stress and fibrosis in incipient myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients.* *Int J Cardiol* 2005;101:53-8.
- Baynes JW, Thorpe SR. *Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm.* *Diabetes* 1999;48:1-9.
- Ceriello A. *New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy.* *Diabetes Care* 2003;26:1589-96.
- Jun JE, Jong H, Chun BY, et al. *Effect of antioxidant supplementation on the lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in patients with coronary heart disease.* *Korean Circ J* 2001;31:1215-24.
- Jain SK, Krueger KS, McVie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T. *Relationship of blood thromboxane-B2 (TxB2) with lipid peroxides and effect of vitamin E and placebo supplementation on TxB2 and lipid peroxide levels in type 1 diabetic patients.* *Diabetes Care* 1998;21:1511-6.
- On YK, Chung WY, Chae IH, et al. *Improvement in endothelial by angiotensin-converting enzyme Inhibitor and vitamin C in essential hypertension.* *Korean Circ J* 2001;31:411-9.
- Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* *J Clin Invest* 1996;97:22-8.
- Karasu C, Ozansoy G, Bozkurt O, Erdogan D, Omeroglu S. *Antioxidant and triglyceride-lowering effects of vitamin E associated with the prevention of abnormalities in the reactivity and morphology of aorta from streptozotocin-diabetic rats: Antioxidants in Diabetes-induced Complications (ADIC) study group.* *Metabolism* 1997;46:872-9.
- Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, et al. *Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats.* *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:959-68.
- Liang Q, Carlson EC, Donthi RV, Kralik PM, Shen X, Epstein PN. *Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy.* *Diabetes* 2002;51:174-81.
- Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, et al. *Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes.* *Diabetes* 2004;53:1336-43.

- 16) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem* 1979;95: 351-8.
- 17) Marklund S, Marklund G. *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem* 1974;47:469-74.
- 18) Aebi H. *Catalase in vitro. Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- 19) Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, et al. *Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. Pharmacol Res* 2003;48: 429-35.
- 20) Shoff SM, Mares-Perlman JA, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Ritter LL. *Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C, and beta-carotene intake in diabetic and non-diabetic older adults. Am J Clin Nutr* 1993;58:412-6.
- 21) Diepeveen SH, Verhoeven GW, van der Palen J, et al. *Effects of atorvastatin and vitamin E on lipoproteins and oxidative stress in dialysis patients: a randomized-controlled trial. J Intern Med* 2005;257:438-45.
- 22) Fernandez-Robredo P, Moya D, Rodriguez JA, Garcia-Layana A. *Vitamins C and E reduce retinal oxidative stress and nitric oxide metabolites and prevent ultrastructural alterations in porcine hypercholesterolemia. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1140-6.
- 23) Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, Lal J, Gupta PK. *Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. Toxicology* 2002;176:165-73.
- 24) Haider B, Yeh CK, Thomas G, Oldewurtel HA, Lyons MM, Regan TJ. *Influence of diabetes on the myocardium and coronary arteries of rheum monkeys fed an atherogenic diet. Circ Res* 1981;49:1278-88.
- 25) Dillmann WH. *Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. Diabetes* 1980;29:579-82.
- 26) Koltai MZ, Balogh I, Wagner M, Pogatsa G. *Diabetic myocardial alterations in ultrastructure and function. Exp Pathol* 1984;25: 215-21.
- 27) Regan TJ, Wu CF, Yeh CK, Oldewurtel HA, Haider B. *Myocardial composition and function in diabetes: the effect of the chronic insulin use. Circ Res* 1981;49:1268-77.
- 28) Mirsky I, Laks MM. *Time course of changes in the mechanical properties of the canine right and left ventricles during hypertrophy caused by pressure overload. Circ Res* 1980;46:530-42.
- 29) Thompson EW. *Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rats and its reversal by insulin treatment. Am J Anat* 1988;182:270-82.
- 30) Granado F, Olmedilla B, Gil-Marinez E, Blanco I, Millan I, Rojas-Hidalgo E. *Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. Clin Sci* 1998;94:189-95.