

Streptozotocin에 의해 유도된 당뇨 쥐의 췌장에 대한 Melatonin의 효과

계명대학교 의과대학 생화학교실, 내과학교실¹, 병리학교실²

이리라 · 문교철 · 최혜정 · 한승엽¹ · 김상표²

Effect of Melatonin on the Pancreas of the Diabetes Mellitus Induced by Streptozotocin in Rats

Ri Ra Lee, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D., Hye Jung Choi, M.S.,
Seung Yup Han, M.D.¹, Sang Pyo Kim, M.D.²

*Department of Biochemistry, Department of Internal Medicine¹, and Department of pathology²,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : The effect of melatonin, a powerful antioxidant, on the pancreas of the diabetes mellitus induced by streptozotocin in male rats was studied. Diabetes was induced by the intraperitoneal injection of 65 mg of streptozotocin per kg of body weight. To know the effect of melatonin, total 10 mg of melatonin per kg of body weight was administered intraperitoneally at the time of streptozotocin and 72 hours after the first administration. Then the rats were sacrificed at the 7 th day after the first injection. Several biochemical parameters, microscopic examination and immunohistochemical stain were done. The injection of streptozotocin caused significant increases in the blood levels of glucose and hemoglobin A1C, and pancreatic levels of hydrogen peroxide and malondialdehyde. Streptozotocin treated group showed the decrease of islets and insulin-immunoreactive cells, and degenerated B cell granules. The injection of melatonin reduced the blood levels of glucose and hemoglobin A1C, and reduced pancreatic levels of hydrogen peroxide and malondialdehyde. Melatonin caused significant increases in the levels of total antioxidant status, superoxide dismutase and catalase. The melatonin treated group showed relatively well preserved cell organelles and Langerhan's islets under the microscopic examination. And the melatonin treated group showed the significant increase in number of insulin-immunoreactive cells compared with streptozotocin treated group under the immunohistochemical stain. These results may suggest that melatonin has a protective effect on the pancreatic islets in the diabetes induced by streptozotocin from oxidative damage by the increase of total antioxidant status via the increased activity of antioxidant enzymes.

Key Words : Antioxidant, Diabetes mellitus, Melatonin, Streptozotocin

서론

당뇨병은 고혈당 및 이에 수반되는 대사 장애를 특징으로 하는 질환군이다. 이 병은 여러 가지 원인이 작용하는 질환군으로서 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍과 조직에서 인슐린 저항성에 의한 인슐린의 작용 저하 등에 의해 발병된다. 당뇨병은 모든 대사성 질환 중 가장 높은 빈도를 차지하며 서구인에서는 인구의 6-7%가 당뇨병 환자로 알려져 있다[1]. 당뇨병을 연구하기 위한 방법으로는 동물에게 streptozotocin을 주입하여 당뇨병을 유발시키는 방법을 사용하고 있다[2,3]. 동물에게 주입한 streptozotocin은 췌장의 베타세포로 이동한 후 세포내의 미토콘드리아를 공격하며 이로 인해 미토콘드리아의 ATP 합성이 억제되고 따라서 미토콘드리아에서는 ADP의 농도가 증가한다[2]. 이렇게 베타세포에서 증가된 ADP는 이화과정에서 hypoxanthine과 xanthine으로 전환되며 다시 이들은 베타세포에 고농도로 존재하는 xanthine oxidase의 촉매로 uric acid와 superoxide 음이온이 된다. 또한 streptozotocin은 직접적으로 xanthine oxidase를 활성화시키기도 하기 때문에 고농도의 xanthine oxidase는 그 촉매능이 상승되고 따라서 superoxide 음이온의 생성은 더욱 촉진된다. 즉 streptozotocin에 의한 당뇨병의 유발은 이와 같은 일련의 과정에서 다량 생성된 superoxide 음이온이 직접 혹은 대사되어 베타세포에 손상을 줌으로써 당뇨를 유발하게 되는 것으로 알려져 있다[2].

포유류의 송과체 호르몬인 melatonin(N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 활성 산소 중 peroxy radical과 가장 반응성이 강한 hydroxyl radical을 분해하는 것으로 알려져 있으며 항산화 효소들을 자극하는 것으로 알려져 있다[4,5]. Melatonin은 saffrole과 같은 발암성 화학물질에 의한 DNA 손상, 방사선에 의한 손상 및 paraquat나 세균의 lipopolysaccharide에 의한 지질 과산화 등을 방지하며 활성산소에 의한 백내장 형성 억제 작용도 있는 것으로 알려져 있으며 [4], streptozotocin에 의한 당뇨병의 유발도 어느 정도

방지하는 것으로 알려져 있다 [6]. 그러나 melatonin에 의한 췌장 보호 작용의 구체적인 기전은 밝혀진 바 없다.

따라서 이 연구에서는 streptozotocin에 의해 당뇨가 유발된 당뇨 쥐의 췌장에 대한 melatonin의 영향을 평가하고자 하였다. 이를 위해 흰쥐에게 streptozotocin을 투여하고 melatonin을 투여한 후 혈당과 췌장에서 과산화수소 생성량, 지질과산화의 지표인 malondialdehyde를 측정하였으며, 췌장조직에 대하여 광학 및 전자현미경 검색을 수행하고 insulin, glucagon, somatostatin에 대한 면역조직화학염색도 수행하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 4 주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 수컷 흰쥐를 사용하였으며 다음과 같이 3 군으로 나누었다. 대조군은 총 10 마리로 쥐를 12시간 금식시킨 후 5% ethanolic saline 용액 4 mL와 1 mmol/L 구연산(citric acid) 완충액(pH 4.5) 1 mL을 복강내로 주입하고 72시간 후 5% ethanolic saline 용액을 다시 4 mL를 주사한 후, 최초의 주사 후 1 주일에 쥐를 희생시켰다. Streptozotocin 투여군(제 1군)은 총 10 마리로 쥐를 12시간 금식시킨 후 5% ethanolic saline 용액을 4 mL와, 체중 kg당 65 mg의 streptozotocin을 1 mmol/L 구연산 완충액 1 mL에 녹여 복강내로 주사하였다. 최초 주사 후 72시간에 다시 5% ethanolic saline 용액 4 mL를 주사하였으며, 최초의 주사 후 1 주일에 쥐를 희생시켰다. Streptozotocin과 melatonin 투여한 melatonin 투여군(제 2군)은 총 10 마리로 쥐를 12시간 금식시킨 후 Floreani 등의 방법[7]에 따라 5% ethanolic saline 용액 4 mL에 melatonin을 체중 kg당 5 mg이 주입되도록 녹인 액을 복강내 주사하고, 체중 kg당 65 mg의 streptozotocin을 1 mmol/L 구연산 완충액 1 mL에 녹여 복강

로 주사하였다. 최초 주사 후 72시간에 다시 5% ethanolic saline 용액 4 mL에 melatonin을 체중 kg당 5 mg이 주입되도록 녹인 액을 다시 복강 주사하고, 최초의 주사 후 1주일에 쥐를 희생시켰다. 각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 삼양유지사료 주식회사 제품인 실험동물 사료를 물과 함께 자유로이 먹도록 하였다.

2. 당 부하 시험

Streptozotocin 투여군 및 melatonin 투여군에서 당뇨병이 잘 유도되었는지 알아보기 위해 처음 streptozotocin 혹은 구연산 완충액을 투여한 후 6일에 공복 시와 포도당(2 g/kg)을 피하에 주입한 후 30분 및 120분에 꼬리의 끝을 잘라 모세혈관 혈액을 채취하여 혈당 값의 변화를 관찰하는 당부하 시험을 실시하여 당뇨 발생을 확인하였다.

3. 시료 제조

흰쥐에서 시료인 혈액 및 췌장의 채취는 가벼운 ether 마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하여 쥐를 실험사 시키고 췌장을 적출하였다. 채혈한 혈액의 일부는 항응고제로 EDTA가 함유된 병에 담아 당화 혈색소(HbA1c) 측정용으로 사용하였으며, 일부의 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 혈청을 얻어 글루코스 및 총항산화 상태 측정용 시료로 사용하였다. 그리고 적출한 췌장의 일부는 면포로 균등히 압박하여 췌장에 남아 있던 혈액을 가능한 한 모두 제거한 다음 즉시 2~4℃로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 9배량의 0.25 mol/L sucrose액을 넣은 다음 teflon pestle glass homogenizer (chamber clearance 0.005~0.007 inches, Wheaton Scientific, Milville, NJ, 미국)로 2~4℃를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10%(w/v)의 췌장 균질액을 만들었다. 이 균질액의 일부를 취하여 과산화수소 농도, superoxide

dismutase 및 catalase 활성도 측정용 시료로 사용하였다. 췌장 균질액 나머지 일부는 10,000 × g(average relative centrifugal force)에서 1시간 원심분리 하여 얻은 상청액인 세포질액을 malondialdehyde 농도와 glutathione peroxidase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

4. 생화학적 검사

혈중 포도당 농도의 측정은 Eiken Chemical사(Tokyo, 일본)의 GLzyme을, 당화 혈색소는 Bio-Rad사(Hercules, CA, 미국)의 DiaSTAT를, 총항산화 상태의 측정은 Randox사(Antrim, 영국)의 total antioxidant status를 사용하여 측정하였다.

췌장 균질액에서 과산화수소의 측정은 ferrous 이온이 산성 조건에서 과산화수소에 의해 ferric 이온이 된 후 xylenol orange와 결합하여 생성하는 화합물을 560 nm에서 측정하는 xylenol orange hydrogen peroxide 측정법[8]을 사용하여 측정하였다.

췌장 세포질에서 malondialdehyde양의 측정은 malondialdehyde가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은 색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법[9]에 의하였다. 즉, 시료를 0.25 N 염산에 0.375%의 thiobarbituric acid와 15% trichloroacetic acid를 함유한 시약과 혼합하고, 반응액을 100℃ 수용액 중에서 15분간 방치한 후 3,000 × g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상청액을 535 nm에서 측정하였다. 시료중 malondialdehyde 농도는 분자흡광계수 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 계산하였다.

췌장 균질액에서 superoxide dismutase의 활성도 측정은 xanthine oxidase를 superoxide 음이온 발생 system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium이 환원되는 양을 측정하는 Sun 등[9]의 방법을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않는 반응액 중의 nitroblue tetrazolium 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

췌장 균질액에서 catalase 활성도의 측정은 과산화수소를 기질로 사용하여 25℃에서 30초 반응시키는 동안에 240 nm 파장에서 과산화수소가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson과 Kiesow[11]의 방법에 의했으며 효소 활성도의 단위는 1 분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 과산화수소를 μmol 로 나타내었다.

췌장 세포질에서 glutathione peroxidase의 활성도 측정은 환원형 glutathione, 과산화수소 및 NADPH를 기질로 사용하고 glutathione reductase를 촉매로 하여 glutathione peroxidase 효소 시료와 함께 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 환원형 glutathione이 과산화수소에 의해 산화형 glutathione으로 되고, 이것이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원형 glutathione으로 환원될 때 NADPH는 산화되며 이 NADPH가 NADP^+ 로 산화되는 정도를 340 nm 파장에서 time scan을 하여 NADPH의 분자흡광계수 ($E_{340\text{nm}}=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 효소의 활성도를 산출하는 방법인 Paglia와 Valentine[12]의 법에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mL의 혈청이 반응하여 산화된 NADP^+ 를 nmol로 나타내었다.

5. 광학 및 전자현미경 관찰

광학현미경 관찰을 위한 시료는 제 1, 2 및 3 군에서 적출된 췌장을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수 및 침투 과정을 거쳐 파라핀에 넣은 후 5 μm 의 박절편을 만들어 H&E 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

췌장조직의 초미형태 관찰을 위해서 투과전자현미경용으로 제공된 췌장의 조직편을 1 mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 mol/L 인산염 완충액, pH 7.4)으로 1~4℃에서 2시간 전고정을 하고 0.1 mol/L 인산염완충 식염수 용액으로 세척한 후 1% OsO_4 용액에 2시간 후고정을 실시한 다음 같은 완충용액으로 세척을 하여 계열 에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환

한 후 epon 혼합물로 포매하여 37℃에서 12시간, 45℃에서 12시간, 60℃에서 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절한 후 toluidine blue 염색을 하여 관찰부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall사(Newtown, CT, 미국)의 MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(60~90 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi사(Tokyo, 일본)의 H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

6. 면역조직화학 염색

대조군 및 각 실험군의 췌장조직을 파라핀으로 포매한 후 5 μm 두께로 박절한 다음 유리슬라이드에 부착시키고 60℃에서 1시간 동안 방치한 후 xylene과 계열에탄올로 탈파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 효소의 차단을 위해 메탄올과 30% H_2O_2 를 9:1로 혼합한 용액에 30분간 실온에서 방치한 후 인산염 완충 식염수용액(pH 7.2)으로 세척하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직내 감추어진 항원을 들어내기 위해 1% zinc sulfate 용액에 담근 뒤 microwave 오븐을 이용하여 10분간 3회 가열하였다. 실온에서 20분 가량 식힌 후 1% 정상 말 혈청(normal horse serum)으로 37℃에서 30분간 둔 후 1:100으로 희석된 20 μL 의 insulin(Biogenex, San Ramon, CA, 미국), glucagon(Biogenex, San Ramon, CA, 미국) 및 somatostatin(Biogenex, San Ramon, CA, 미국)에 대한 일차항체를 각각 조직절편위에 놓고 coverslip을 덮은 다음 37℃에서 2시간 반응시켰다. 인산염 완충 식염수용액으로 세척 후 이차항체(biotinylated anti-mouse IgG, Vectastain Elite kit, USA)를 가하여 37℃에서 30분간 둔 후 인산염완충 식염수용액으로 세척하였다. Avidin-biotin peroxidase complex(Vector, USA)을 1:200으로 희석하여 조직절편위에 적당량 놓은 후 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 인산염완충 식염수 용액으로 세척하고 DAB(3,3'-

diaminobenzidine tetrahydrochloride) - 과산화 수소 용액으로 10~20분간 실온에서 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 관찰하였다. Insulin, glucagon 및 somatostatin에 대한 양성대조군으로는 정상 흰쥐의 췌장 조직을 사용하였고 음성대조군은 일차항체 대신 인산염완충 식염수용액을 사용하여 위의 동일한 과정에 의해 염색을 시행하였다. 결과의 판독은 6개의 대표적인 islets에서 면역반응을 보이는 세포수를 세어서 한 Langerhans islet당 면역반응 세포수로 나타내었다.

7. 성적검정

값은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 각 군의 비교는 Student's t-test를 사용하였으며 p 값이 0.05 이하를 유의수준으로 하였다.

성 적

1. 혈중 포도당 농도

각 실험군의 혈중 포도당 농도는 Fig. 1과 같다. 즉, 대조군에서 혈청 포도당 농도는 135 ± 6 mg/100 mL이었으며, streptozotocin 투여군에서는 522 ± 95 mg/100 mL로 대조군의 포도당 농도에 비해 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.001$). Melatonin 투여군에서는 포도당 농도는 435 ± 46 mg/100 mL로 대조군에 비해 증가되었으나($p < 0.001$), streptozotocin 투여군의 포도당 농도보다는 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

2. 혈중 당화 혈색소 농도

각 실험군에서 혈중 당화 혈색소 농도는 Fig. 2와 같다. 즉, 대조군에서 혈중 당화 혈색소 농도는 $2.17 \pm 0.28\%$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $4.06 \pm 0.46\%$ 로 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.001$). Melatonin 투여군에

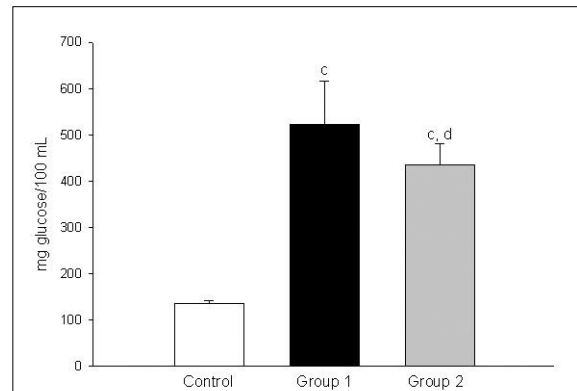


Fig. 1. Effect of melatonin on the glucose levels in the serum. Significantly different from control (c, $p < 0.001$), and from group 1 (d, $p < 0.05$). Group 1; The group which received only streptozotocin, Group 2; The group which received melatonin with streptozotocin.

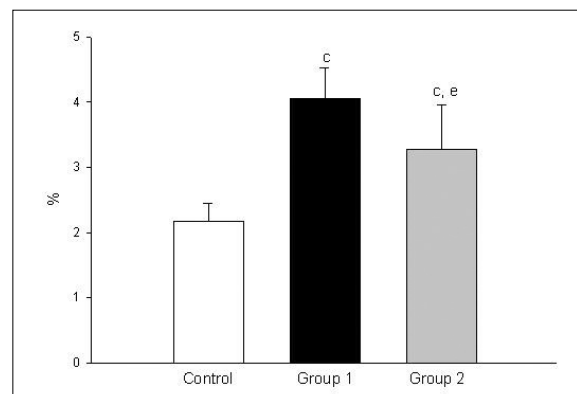


Fig. 2. Effect of melatonin on the hemoglobin A1c levels in the blood. Significantly different from control (c, $p < 0.001$) and from group 1 (e, $p < 0.01$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

서는 당화 혈색소 농도는 $3.27 \pm 0.68\%$ 로 대조군의 당화 혈색소 농도에 비해 유의하게 증가되나($p < 0.001$), streptozotocin 투여군보다는 유의하게 낮았다($p < 0.01$).

3. 총 항산화 상태

각 실험군에서 혈중 총항산화 상태는 Fig. 3과

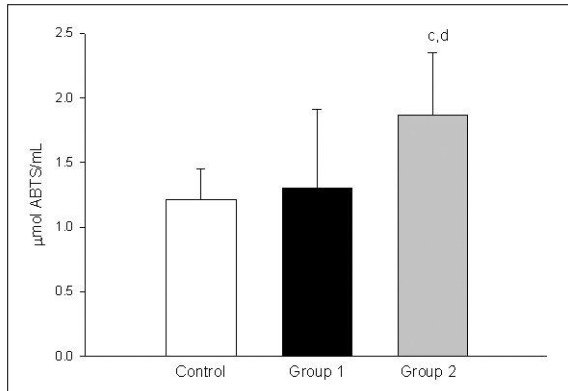


Fig. 3. Effect of melatonin on the total antioxidant status levels in the serum. Significantly different from control (c, $p<0.001$) and from group 1 (d, $p<0.05$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text. ABTS: 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin sulfonate).

같다. 즉, 대조군에서 혈중 총항산화 상태는 $1.21 \pm 0.24 \mu\text{mol } 2,2'\text{-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin sulfonate) \{ABTS\}/mL}$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $1.30 \pm 0.61 \mu\text{mol ABTS/mL}$ 로 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. Melatonin 투여군에서는 총항산화 상태가 $1.87 \pm 0.48 \mu\text{mol ABTS/mL}$ 로 대조군 ($p<0.001$) 및 streptozotocin 투여군 ($p<0.05$)에 비해 각각 유의한 증가를 나타내었다.

4. 췌장의 과산화수소 농도

각 실험군에서 췌장 균질액의 과산화수소 농도는 Fig. 4와 같다. 즉, 대조군에서 과산화수소의 농도는 $4.75 \pm 1.78 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $8.69 \pm 1.48 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$ 으로 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다 ($p<0.001$). Melatonin 투여군에서 과산화수소의 농도는 $7.29 \pm 1.41 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$ 으로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 ($p<0.001$) streptozotocin 투여군에 비해서는 유의하게 낮았다 ($p<0.05$).

5. 췌장의 malondialdehyde 농도

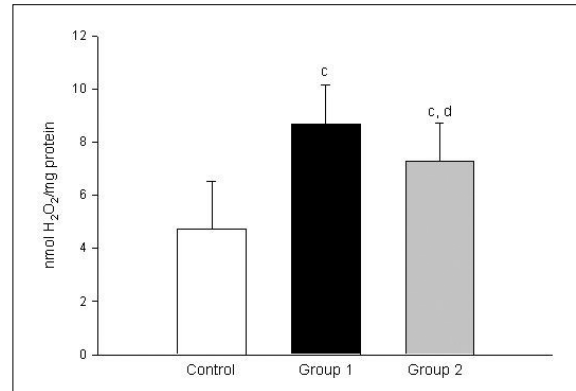


Fig. 4. Effect of melatonin on the hydrogen peroxide levels in the pancreas. Significantly different from control (c, $p<0.001$) and from group 1 (d, $p<0.05$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

각 실험군에서 췌장 세포질의 malondialdehyde 농도는 Fig. 5와 같다. 즉, 대조군에서 malondialdehyde 농도는 $3.00 \pm 0.41 \text{ nmol/mg protein}$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $4.77 \pm 0.62 \text{ nmol/mg protein}$ 으로 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다 ($p<0.001$). Melatonin 투여군에서 malondialdehyde 농도는 $4.02 \pm 0.70 \text{ nmol/mg protein}$ 으로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 ($p<0.001$) streptozotocin 투여군에 비해서는 유의하게 낮았다 ($p<0.05$).

6. 췌장의 superoxide dismutase 활성도

각 실험군에서 췌장 균질액중 superoxide dismutase 활성도 변동은 Fig. 6과 같다. 대조군에서 superoxide dismutase 활성도는 $27.63 \pm 11.43 \text{ unit/min/mg protein}$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $33.77 \pm 14.65 \text{ unit/min/mg protein}$ 으로 대조군과 유의한 차이가 없었다. Melatonin 투여군에서 superoxide dismutase 활성도는 $55.15 \pm 26.44 \text{ unit/min/mg protein}$ 으로 대조군 ($p<0.05$) 및 streptozotocin 투여군 ($p<0.05$)에 비해 각각 증가

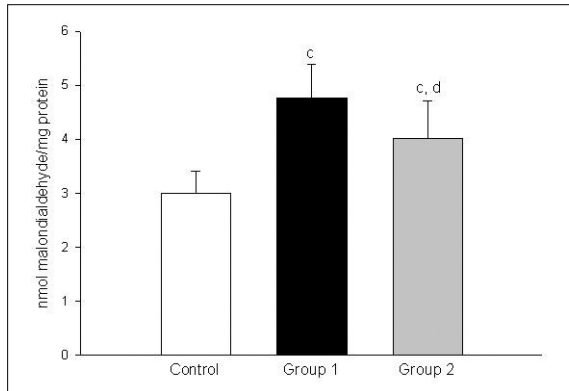


Fig. 5. Effect of melatonin on the malondialdehyde levels in the pancreas. Significantly different from control (c, $p<0.001$) and from group 1 (d, $p<0.05$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

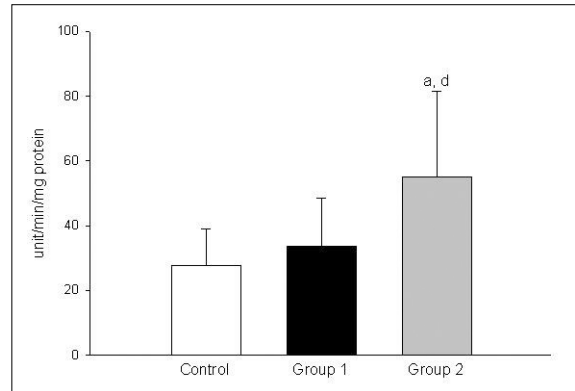


Fig. 6. Effect of melatonin on the superoxide dismutase activity in the pancreas. Significantly different from control (a, $p<0.05$) and from group 1 (d, $p<0.05$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text. One unit of superoxide dismutase activity was defined as the amount which inhibited the reduction of cytochrome c by 50%.

하였다.

7. 췌장의 catalase 활성도

각 실험군에서 췌장 균질액의 catalase 활성도 변동은 Fig. 7과 같다. 대조군에서 catalase 활성도는 $0.62 \pm 0.16 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $0.60 \pm 0.20 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$ 으로 대조군과 유의한 차이가 없었다. Melatonin 투여군에서 catalase 활성도는 $0.97 \pm 0.31 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$ 으로 대조군 ($p<0.01$) 및 streptozotocin 투여군 ($p<0.01$)에 비해 각각 증가하였다.

8. 췌장의 glutathione peroxidase 활성도

각 실험군에서 췌장 세포질의 glutathione peroxidase 활성도는 Fig. 8과 같다. 대조군에서 glutathione peroxidase 활성도는 $2.31 \pm 0.50 \text{ nmol NADP}^+/\text{min/mg protein}$ 이었으며, streptozotocin 투여군에서는 $1.17 \pm 0.58 \text{ nmol NADP}^+/\text{min/mg protein}$ 으로 대조군에 비해 유의

한 감소 ($p<0.001$)를 나타내었다. Melatonin 투여군에서 glutathione peroxidase 활성도는 $1.38 \pm 0.68 \text{ nmol NADP}^+/\text{min/mg protein}$ 으로 대조군에 비해서는 유의한 감소 ($p<0.01$)를 나타내었으나, streptozotocin 투여군과는 큰 차이가 없었다.

9. 광학 및 전자 현미경 소견

광학 현미경 소견은 Fig. 9와 같다. 즉, 대조군에서 췌장의 islet는 잘 유지되어 있는데 비해, streptozotocin 투여군에서는 islet 수 및 크기가 현저히 감소하였다. Melatonin 투여군에서도 islet 수 및 크기가 감소되는 경향을 보였으나 streptozotocin 투여군에 비해서는 그 정도가 덜하였다(Fig. 9).

투과전자현미경 소견은 Fig. 10과 같다. 즉, 대조군에서 췌장의 특이한 초미형태학적 변화를 관찰할 수 없었다. Streptozotocin 투여군에서 대조군에 비해 β 세포과립들의 변성이 현저하였으나, melatonin 투여군에서는 비교적 보존된 β 세포과립을 관찰할 수 있었다. α 세포들은 대조군, streptozotocin 투여군과 melatonin 투여군간에

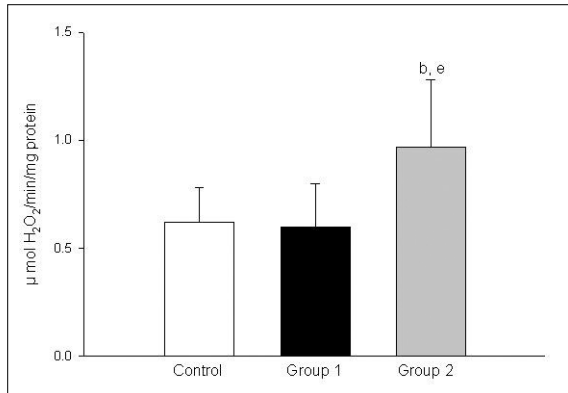


Fig. 7. Effect of melatonin on the catalase activity in the pancreas. Significantly different from control (b, $p<0.01$) and from group 1 (e, $p<0.01$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

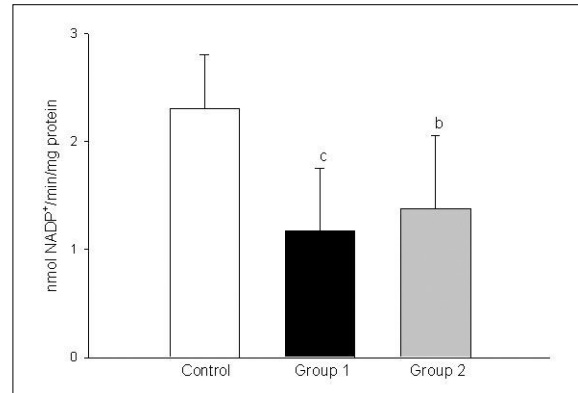


Fig. 8. Effect of melatonin on the glutathione peroxidase activity in the pancreas. Significantly different from control (b, $p<0.01$; c, $p<0.001$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

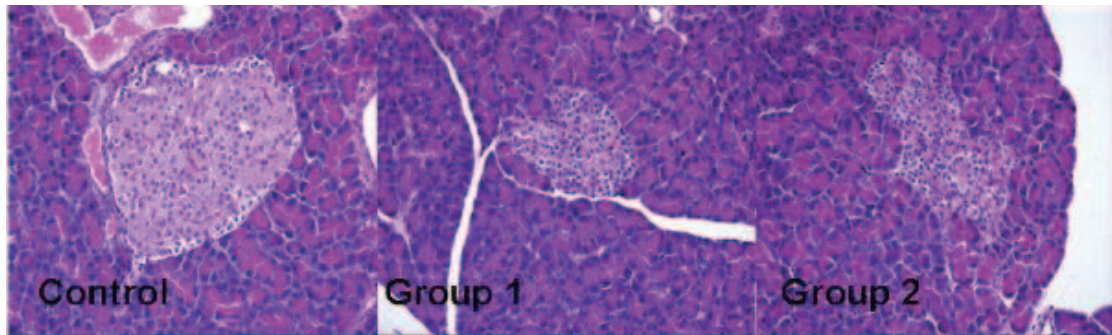


Fig. 9. Light microscopic findings on the pancreas. Islet cells were well preserved in control group. Islet cells in group 1 were decreased in their size and number in group 1. Islet cells in group 2 were decreased in their size and number, however, relatively well preserved than group 1 (H&E stain, $\times 100$). Control and experimental groups are described in Fig.1 and text.

특이한 초미형태학적 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 10).

10. 면역조직화학 결과

Insulin에 대한 Langerhans islet 당 면역반응 세포수와 면역반응 세포소견은 Fig. 11과 같다. 대조군의 islet에서 insulin 면역반응 세포 수는 198 ± 63 개/islet이었으며, streptozotocin 투여군에서는 24 ± 9 개/islet로 대조군에 비해 유의한 감소($p<0.001$)를 나타내었다. Melatonin 투여군에

서 insulin 면역반응 세포 수는 114 ± 72 개/islet로 대조군에 비해서는 유의한 변화가 없었으나, streptozotocin 투여군에 비해서는 유의한 증가($p<0.05$)를 나타내었다.

Glucagon에 대한 Langerhans islet 당 면역반응 세포수와 면역반응 세포소견은 Fig. 12와 같다. 대조군의 islet에서 glucagon 면역반응 세포수는 108 ± 58 개/islet이었으며, streptozotocin 투여군에서는 135 ± 15 개/islet로 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다. Melatonin 투여군에서 glucagon 면역반응 세포수는 138 ± 47 개/islet

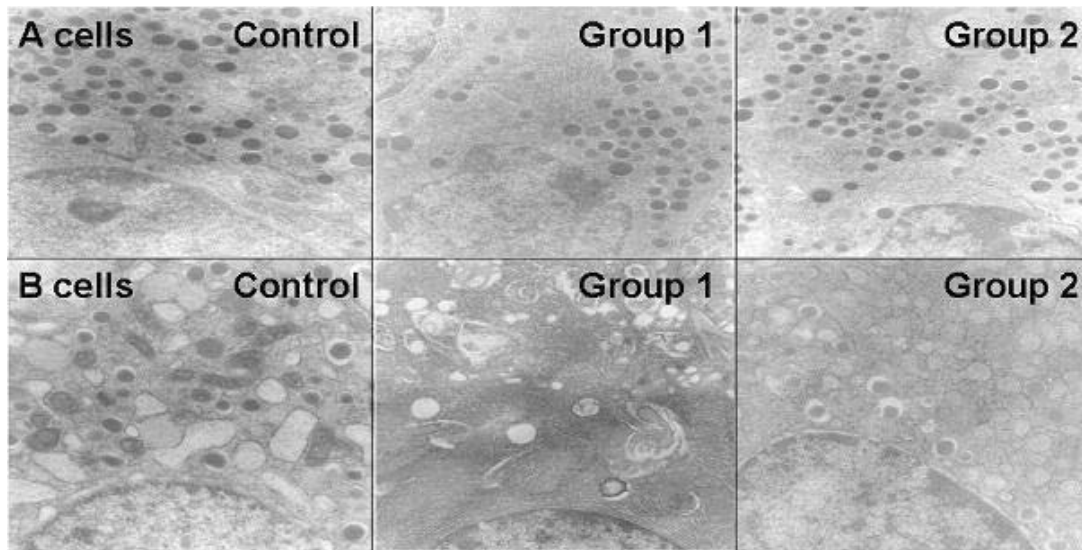


Fig. 10. Electron microscopic findings on the pancreas. In group 1, α cells in islet showed well-preserved round, highly electron-dense granules in cytoplasm, and β cells in islet showed many degenerated cell granules (B, TEM, original magnification $\times 15,000$). A cells: α cells; B cells: β cells. Control and experimental groups are described in Fig. 1 and text.

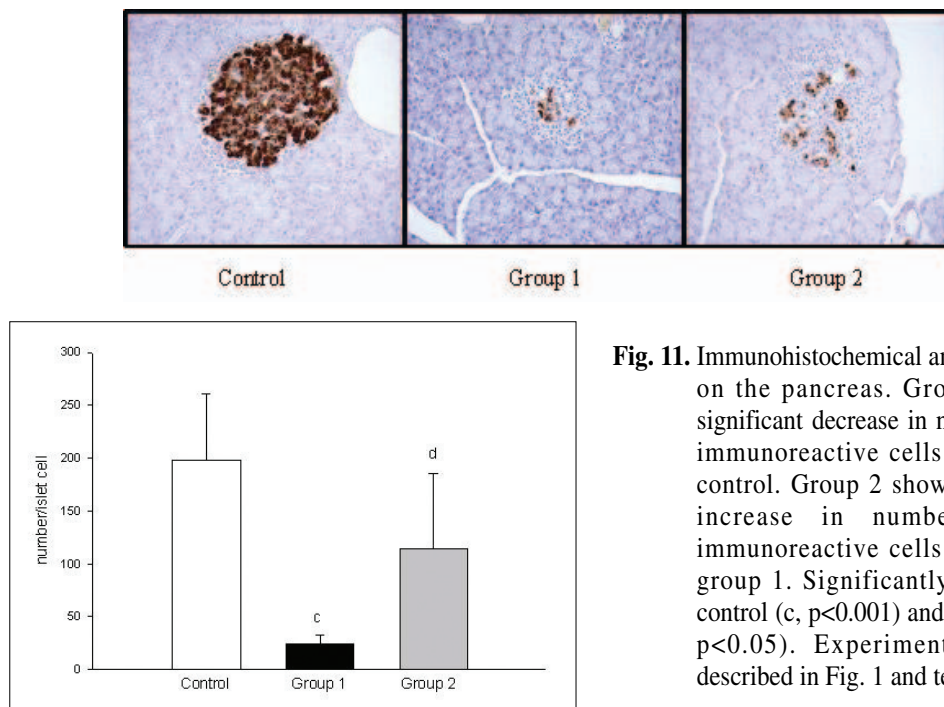


Fig. 11. Immunohistochemical analysis for insulin on the pancreas. Group 1 showed a significant decrease in number of insulin immunoreactive cells compared with control. Group 2 showed a significant increase in number of insulin immunoreactive cells compared with group 1. Significantly different from control (c, $p < 0.001$) and from group 1 (d, $p < 0.05$). Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

로 대조군 및 streptozotocin 투여군에 비해서 유의한 변화가 없었다.

Somatostatin에 대한 Langerhans islet 당 면역반응 세포수와 면역반응 세포소견은 Fig. 13과

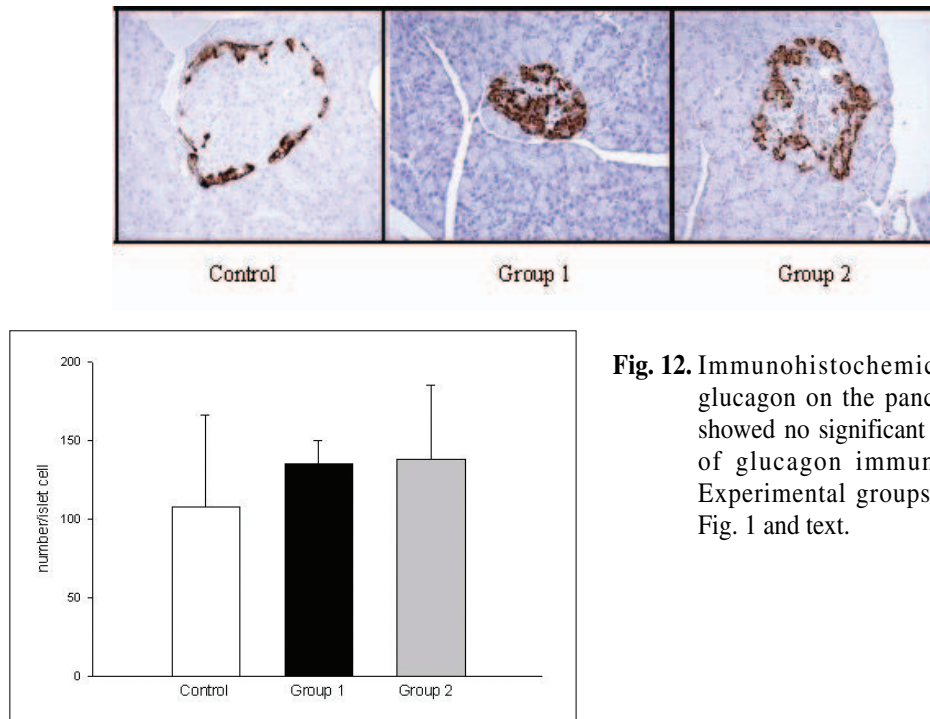


Fig. 12. Immunohistochemical analysis for glucagon on the pancreas. Each group showed no significant change in number of glucagon immunoreactive cells. Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

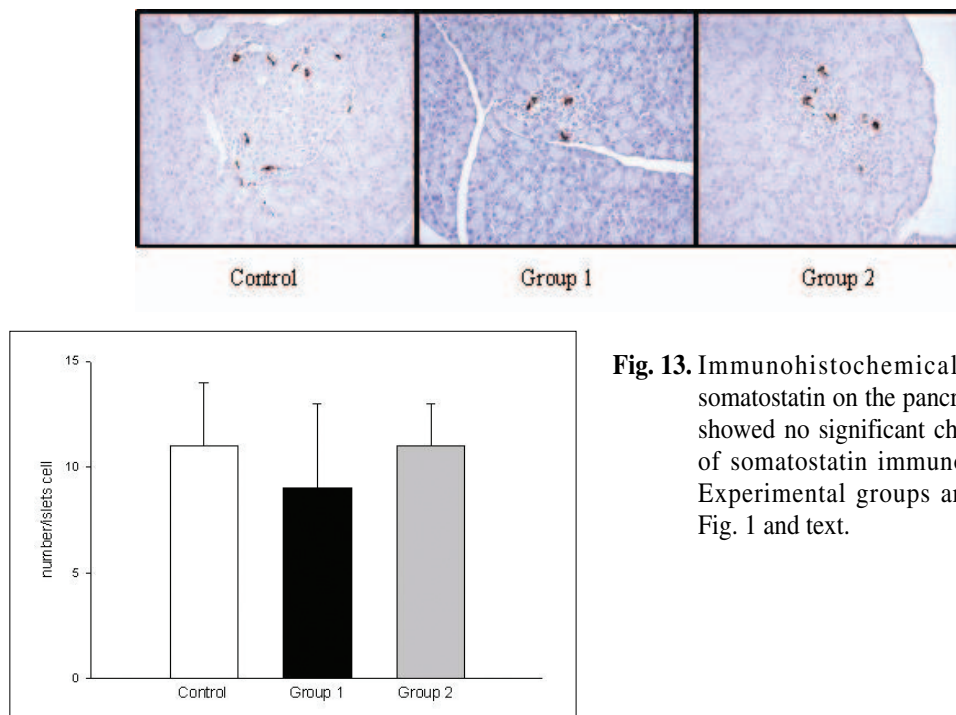


Fig. 13. Immunohistochemical analysis for somatostatin on the pancreas. Each group showed no significant change in number of somatostatin immunoreactive cells. Experimental groups are described in Fig. 1 and text.

같다. 대조군의 islet에서 somatostatin 면역반응 세포 수는 11 ± 3 개/islet이었으며, streptozotocin 투여군에서는 9 ± 4 개/islet로 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다. Melatonin 투여군에서 somatostatin 면역반응 세포수는 11 ± 2 개/islet로 대조군 및 streptozotocin 투여군에 비해서 유의한 변화가 없었다.

고 찰

활성산소(oxygen free radical)는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자로서 우리 몸은 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역체계를 통해 끊임없이 생성한다[13,14]. 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학물질도 생성하지 못한다. 활성산소는 반응성이 높아 생체분자들의 구조와 기능을 변화시켜 신체에 손상을 끼치며 여러 가지 질병을 일으키는 원인으로 작용한다[13-15]. 이러한 과잉의 통제되지 않는 활성산소의 세포손상 작용이 지속되어 동맥경화[16], 심장질환[17,18], 염증[15], 암[15,19,20] 및 노화[19,21,22] 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 활성산소는 인체에서 당뇨병 및 당뇨병의 각종 합병증에 관여하는 것 [2,23-25]으로 알려져 있으며 streptozotocin에 의한 당뇨병의 유발에도 관여하는 것[6]으로 알려져 있다.

활성산소 중 superoxide 음이온이 가장 먼저 형성되는데, 이 superoxide 음이온은 superoxide dismutase의 작용을 받아 과산화수소가 된다[26]. 이 과산화수소는 금속 이온의 작용을 받아 활성산소 중 가장 반응성이 강한 hydroxyl radical을 형성하게 된다[26]. 이러한 hydroxyl radical을 제거하며 항산화 효소들의 활성을 자극하는 것으로 알려진 melatonin[4,5]에 의한 체장 보호 작용의 구체적인 기전은 밝혀진 바 없다. 따라서 이 연구에서는 streptozotocin에 의해 당뇨가 유발된 당뇨 쥐의 체장에 대한 melatonin의 영향을 평가하고자 하였다. 이를 위해 흰쥐에게 streptozotocin을 투

여하고 melatonin을 투여한 후 혈당과 총항산화 상태를 평가하여 melatonin이 혈당과 총항산화 상태에 미치는 영향을 알아보았으며, 또한 췌장에서 과산화수소의 양과 지질 과산화의 지표인 malondialdehyde 및 항산화 대사 효소들을 측정하여 활성산소의 발생과 이로 인한 손상 및 관계되는 주요 항산화효소들의 활성도의 변동에 미치는 melatonin의 영향을 평가하였다. 췌장조직에 대하여 광학 및 전자현미경 검사를 수행하고 insulin, glucagon, somatostatin에 대한 면역조직화학염색도 수행하여 형태학적 변화를 확인하고자 하였다.

이 실험에서 streptozotocin을 투여하였을 때 혈중의 포도당 농도 및 당화 혈색소 농도는 정상 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으며, 이러한 포도당 및 당화 혈색소 농도의 증가는 melatonin의 투여로 유의한 감소를 나타내었다. 이는 이전의 실험 성적 [6]과도 일치하였다. 이러한 결과는 melatonin의 투여가 streptozotocin에 의한 당뇨병 유발을 완벽하게 막을 수는 없지만 유의하게 혈당의 상승을 저해하는 효과는 나타내었기 때문이라 생각된다.

총항산화 상태는 streptozotocin 투여군에서는 별다른 변화가 없었으나 melatonin 투여군에서는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 이는 melatonin이 활성산소 제거 효과 외에 항산화효소 활성 자극 효과도 있는 것으로 알려져 있는 만큼 항산화효소의 활성 자극 효과 등에 기인된 것으로 생각되며 melatonin의 이러한 총항산화 상태 증가 효과는 결국 활성산소에 의한 손상을 줄여 streptozotocin에 의한 당뇨병 유발을 방지하는데 기여한 것으로 생각된다.

활성산소의 하나인 과산화수소 농도가 streptozotocin 투여군에서는 대조군에 비해 증가되나 melatonin을 투여하면 streptozotocin만을 투여한 군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 melatonin의 활성산소 제거 및 항산화 효소활성 자극 효과에 기인된 것으로 생각된다. 그리고 활성산소에 의한 손상을 나타내는 지표로 사용되는 malondialdehyde 농도 [27]는 streptozotocin 투여군에서는 대조군에 비해 증가

되나 melatonin을 투여하면 streptozotocin만을 투여한 군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 따라서 이는 streptozotocin에 의해 생성되는 활성 산소가 melatonin 투여로 제거되어 과산화수소의 농도가 낮아지고 이는 산화적 손상의 감소로 이어진 결과로 생각된다.

Streptozotocin을 투여한 군에서 항산화효소들인 superoxide dismutase와 catalase는 별다른 변화가 없었으며 glutathione peroxidase의 활성도는 오히려 감소되었다. 그러나 melatonin 투여군에서는 이들 항산화효소들의 활성도가 streptozotocin 투여군에 비해 증가되었다. Streptozotocin을 투여한 군에서는 과산화수소를 비롯한 활성산소들이 증가되어도 항산화효소들이 이를 처리하지 못하는 것을 반영하는 것으로 생각되고, melatonin 투여군에서는 melatonin이 항산화효소들의 활성을 증가시켜 과산화수소를 제거하며 이는 malondialdehyde의 양적 감소를 초래한 것으로 생각된다. 또한 melatonin 투여군에서 superoxide dismutase의 활성도는 증가되었는데 이는 Reiter 등 [28]의 보고와 일치한다. 이러한 melatonin에 의한 항산화효소 자극 효과와 활성산소 처리 효과가 상승적으로 작용하여 melatonin 투여군의 활성산소에 의한 손상이 줄어든 것으로 생각된다.

광학현미경 소견 및 투과전자현미경 소견에서 보면 streptozotocin 투여군에서는 islet 수 및 크기가 현저히 감소하였고 베타세포 과립들의 변성이 현저하였으나, melatonin 투여군에서는 이러한 변화들이 현저히 적었다. Insulin에 대한 면역조직화학염색 결과 Langerhans islet 당 insulin에 대한 면역반응 세포수는 streptozotocin 투여군에서는 대조군에 비해 현저히 감소하나 melatonin 투여군에서는 정상화되는 모양을 나타내었다. 이는 melatonin 투여로 활성 산소에 의한 손상 감소가 췌장 베타세포를 보호하여 형태학적 손상이 감소된 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 melatonin은 췌장에서 항산화효소들을 자극함으로써 총항산화 상태를 증가시키고 streptozotocin에 의한 산화적 손상을 방지

하여 췌장을 보호함으로써 streptozotocin에 의한 당뇨병의 유발을 방지하는 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

요 약

활성산소를 제거하며 항산화효소들의 활성을 자극하는 것으로 알려진 melatonin에 의한 췌장 보호 효과를 알아보기 위하여 streptozotocin에 의해 당뇨가 유발된 당뇨 쥐에 melatonin을 병행 투여하여 그 영향을 평가하였다. 숫 흰쥐에서 체중 kg당 65 mg의 streptozotocin을 단회 복강내 투여하여 당뇨병을 유발하였으며, melatonin의 투여는 streptozotocin 투여 시와 streptozotocin 투여 후 72시간에 각각 체중 kg당 5 mg의 melatonin을 복강 투여하였다. 최초 약물 투여 후 7일에 쥐를 희생시킨 후 혈중 포도당 농도와 당화 혈색소의 농도, 총 항산화 상태, 지질 과산화의 지표인 malondialdehyde의 농도 및 항산화효소 활성도, 광학 및 전자현미경 검색 및 insulin, glucagon, somatostatin에 대한 면역조직화학염색도 수행하였다. Streptozotocin을 투여하였을 때 혈중의 포도당 농도 및 당화 혈색소 농도, 췌장의 과산화수소 농도, malondialdehyde 농도는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으며, 총항산화 상태, superoxide dismutase 및 catalase는 대조군에 비해 별다른 변화를 나타내지 않았다. Melatonin과 streptozotocin을 병행 투여한 melatonin 투여군에서는 혈중 포도당 농도와 당화 혈색소의 농도, 총 항산화 상태, 과산화수소의 농도 및 malondialdehyde의 농도는 streptozotocin만 투여한 군에 비해 감소되었으며, superoxide dismutase 및 catalase 활성도는 streptozotocin만 투여한 군에 비해 증가되었다. 광학현미경 소견 및 투과전자현미경 소견에서 보면 streptozotocin 투여군에서는 islet 수 및 크기가 현저히 감소하였고 B 세포과립들의 변성이 현저하였으나, melatonin 투여군에서는 이러한 변화들이 현저히 적었다. Insulin에 대한 면역조직화학염색 결과

Langerhans islet 당 insulin에 대한 면역반응 세포수는 streptozotocin 투여군에서는 대조군에 비해 현저히 감소하나 melatonin 투여군에서는 정상화되었다. Glucagon과 somatostatin에 대한 면역조직화학염색 결과는 각 군 상호간에 별다른 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로 보아 melatonin은 췌장에서 항산화효소들을 자극함으로써 총항산화 상태를 증가시키고 streptozotocin에 의한 산화적 손상을 방지하여 췌장을 보호함으로써 streptozotocin에 의한 당뇨병의 유발을 방지하는 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Powers AC. Diabetes mellitus. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Long DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001, p. 2109-37.
2. Kawada J. New hypotheses for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus. *Yakugaku Zasshi* 1992;**112**:773-91.
3. Jorns A, Klempnauer J, Tiedge M, Lenzen S. Recovery of pancreatic beta cells in response to long-term normoglycemia after pancreas or islet transplantation in severely streptozotocin diabetic adult rats. *Pancreas* 2001;**23**:186-96.
4. Reiter RJ. Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging* 1995;**7**:340-51.
5. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**939**:200-15.
6. 이리라, 김여희, 박춘식, 여미영, 문교철, 흰쥐에서 Streptozotocin에 의해 유도된 당뇨병에 대한 Melatonin의 효과. *당뇨병* 2002;**26**:357-65.
7. Floreani M, Skaper SD, Facci L, Lipartiti M, Giusti P. Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *FASEB J* 1997;**11**:1309-15.
8. Bleau G, Giasson C, Brunette I. Measurement of hydrogen peroxide in biological samples containing high levels of ascorbic acid. *Anal Biochem* 1998;**263**:13-7.
9. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. Vol 52. New York: Academic Press; 1978, p. 302-10.
10. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;**34**:497-500.
11. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in UV). *Anal Biochem* 1972;**49**:474-8.
12. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;**70**:158-69.
13. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: Armstrong D, editor. *Free Radicals in Diagnostic Medicine: a systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York: Plenum Press; 1994, p. 17-27.
14. Punchard NA, Kelly FJ. Introduction. In: Punchard NA, Kelly FJ, editors. *Free Radicals: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1996, p. 1-8.
15. Lin CC, Hsu YF, Lin TC. Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins of Terminalia catappa L. *Anticancer Res* 2001;**21**:237-43.
16. Reaven PD. Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation. In: Armstrong D, editor. *Free Radicals in Diagnostic Medicine: a systems approach to laboratory technology, clinical*

- correlations, and antioxidant therapy*. New York: Plenum Press; 1994, p. 113-28.
17. Ferrari R. Oxygen free radicals at myocardial level: Effect of ischemia and reperfusion. In: Armstrong D, editor. *Free Radicals in Diagnostic Medicine: a systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York: Plenum Press; 1994, p. 99-112.
 18. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, *et al*. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 2001;**47**:887-92.
 19. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In: Halliwell B, Aruoma OI, editors. *DNA and Free Radicals*. New York: Ellis Horwood; 1993, p. 1-15.
 20. Brozmanova J, Dudas A, Henriques JA. Repair of oxidative DNA damage. An important factor reducing cancer risk. *Neoplasma* 2001;**48**:85-93.
 21. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001;**8**:851-62.
 22. Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001;**305**:75-80.
 23. Vinson J, Hus C, Possanza C, Drack A, Pane D, Davis R, *et al*. Lipid peroxidation and diabetic complications: effect of antioxidant vitamins C and E. In: Halliwell B, Aruoma OI, editors. *DNA and Free Radicals*. New York; Ellis Horwood: 1993, p. 430-2.
 24. Fabryova L, Cagan S. Free oxygen radicals in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Bratisl Lek Listy* 1995;**96**:23-9.
 25. Feldman EL, Stevens MJ, Greene DA. Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin Neurosci* 1997;**4**:365-70.
 26. Murray RK. Red and white blood cells. In: Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. London: Appleton & Lange; 2000, p. 763-79.
 27. Brown RK, Kelly FJ. Peroxides and other products. In: PUNCHARD NA, Kelly FJ, editors. *Free Radicals: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1996, p. 119-31.
 28. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997;**29**:363-72.