

## 인슐린으로 치료한 제2형 당뇨병 모델 쥐의 당뇨병성 만성 합병증

아주대학교 의과대학 내분비 대사학교실, 생리학교실<sup>1</sup>

박지원 · 이성규 · 김호정 · 노혜림 · 하창영 · 이수진 · 정윤석 · 이관우 · 김현만 · 백은주<sup>1</sup>

### Chronic Diabetic Complications in the Insulin-Treated Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus.

Jee Won Park, M.D., Sung Kyu Lee, M.D., Ph.D., Hyo Jung Kim, M.D., Hae Lim Noh,  
Chang young Hah, M.D., Su Jin Lee, M.D., Yoon Sok Chung, M.D., Ph.D.,  
Kwan Woo Lee, M.D., Ph.D., Hyun Man Kim, M.D., Ph.D., Eun Ju Paek, M.D., Ph.D<sup>1</sup>

*Department of Endocrinology and Metabolism, Ajou University, School of Medicine and  
Department of Physiology<sup>1</sup>, Suwon, Korea*

#### - Abstract -

**Background:** Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) is a characterized by insulin resistance and impairment of beta cell function. OLETF male rat usually developed NIDDM and obesity at 20 weeks old spontaneously. It is a metabolically characterized by insulin resistance in onset of early disease. However, body weight and insulin secretory function was gradually reduced during the diabetes developed. These characteristics of disease is similar to Korean type 2 diabetic patients. NIDDM patients in Korea are thought to be different from traditional NIDDM in western countries. They are non obese type and also has reduced insulin secretory function compared to western countries. These patients are not easily managed on diet and/or oral hypoglycemic agent. Reduced C-peptide and insulin concentrations in these patients are similar to patients with IDDM. In these patients, insulin therapy is effective to control glucose level. Therefore, we investigated the effect of insulin and oral hypoglycemic therapy to glucose control and severity of chronic complications in OLETF male rats of 6weeks (42 weeks old) and 14 weeks (50 weeks old) treated groups.

**Material and methods:** The OLETF male rats which are 36 weeks old is diagnosed to NIDDM. A total of 20 rats were stratified into the three groups: control group (n=3), OHA's group; rats treated by OHA's (n=3) and insulin group; rats treated with insulin (n=4). We evaluated anthropometry, fasting glucose and 75 gram OGATT, nerve conduction studies, sclerotic degree of kidney and thickness of carotid arteries at 42 and 50 weeks old.

**Results:** In the 42 weeks old groups (6 weeks treated group), there was a significant difference in weight gain in group 3 but no differences were observed in kidney tissue pathology and thickness of carotid arteries. In the 50 weeks old groups (14 weeks treated group), there were also no changes in the kidneys and arteries, but weight gain and peak amplitude in NCV was significantly higher in insulin - treated group.

**Conclusions:** OLETF male rats as NIDDM animal model, with late stage diabetic complications show weight loss and decreased insulin secretory capacity. Insulin treated group shows improved blood glucose control. Also it showed improved severity of diabetic neuropathy (J Kor Diabetes Asso 25:200~210, 2001).

**Key Words:** OLETF rat, Insulin secretory capacity, Diabetic neuropathy, Insulin treatment

## 서 론

당뇨병은 절대적인 인슐린 분비능의 부족으로 생기는 인슐린성 의존형 당뇨병 (제1형 당뇨)과 인슐린의 분비능은 유지 및 증가되었으나 이에 대한 표적 장기들의 저항성으로 생기는 비인슐린 의존성 당뇨병 (제2형 당뇨)으로 구분하며 그 치료법도 구별된다. 한편 한국인의 경우에는 서양인에 비해 인슐린 분비능이 낮은 것으로 보고되고 있으며 당뇨병의 유행기간이 길어질수록 인슐린 분비능이 현저히 저하됨을 관찰할 수 있다<sup>1,2)</sup>. 따라서 제2형 당뇨병이라도 인슐린 치료가 혈당 조절 및 증상 조절에 필요한 경우가 있다.

최근 혈당 조절에 대한 연구에선 1993년 DCCT<sup>3)</sup> (Diabetes Control and Complication Trial: 당뇨병 조절과 합병증 연구), 1995년 Okubo 등<sup>4)</sup>의 연구 및 1998년 UKPDS (영국 당뇨병 합병증 예방연구)<sup>5)</sup> 결과로써 엄격한 혈당의 조절은 당뇨병성 만성 합병증의 진행을 지연시킴을 확인하였다. 이상의 연구는 적극적인 혈당 조절으로 미세 혈관 합병증의 발생이 지연되고 예방될 수 있음을 증명한 것이다.

OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 쥐는 자연발생적인 제2형 당뇨병의 모델로 고혈당과 만성 합병증이 진행된다. 이 모델의 특징으로 OLETF 웅성 쥐는 5주령부터 당뇨병이 병발하지 않는 LETO 군에 비해 체중의 증가가 나타나며 40주령에는 대조군

에 비해 200 g 정도의 체중증가가 나타난다<sup>6,7)</sup>. OLETF 쥐의 혈당치는 18주부터는 대조군 (LETO 쥐) 보다 높은 혈당치를 보이며 경구 당부하검사상 24주부터 명확한 당뇨가 나타난다. 또한 OLETF 쥐의 인슐린의 기저 분비능도 24주부터 증가되어 55주령에는 최고치에 도달하여 대조군과 유의한 차이를 나타낸다. 하지만 OLETF 쥐는 당뇨가 진행하여 혈당치가 증가되지만 요당이 측정되는 시점에서부터는 인슐린치는 감소하기 시작하여 65주령에는 대조군인 LETO 쥐에 비해서 인슐린치가 감소되며, 이 시기에는 인슐린 치료가 필요하였고 치료 이후 체중의 증가도 나타난 것으로 보고되고 있다<sup>7)</sup>. 또한 당뇨병성 신증에 대해서 OLETF 쥐는 30주령부터 대조군보다 단백뇨가 많아지며 55주령에는 하루 800 mg 이상의 단백뇨가 나오며 40주 이후에는 해부학적으로도 혈관간 기질 (mesangial matrix) 과 사구체 기저막의 비후를 나타낸다. 70주령에는 PAS 양성 결절성 병변이 사구체 전반에서 관찰된다고 보고되었다<sup>6)</sup>. 특히 당뇨병성 신경증의 경우 1형 당뇨 모델인 쥐에 비해 형태적인 손상은 적으나 기능적 손실이 심하다고 알려져 있다. 또한 이러한 손상은 고혈당으로 인한 대사성 영향과 이에 따른 허혈성 효과의 복합적인 기전으로 설명되어지고 있으며 이에 대한 객관적 측정지표는 신경전도 검사로 알려져 있다.

연구자는 실험 동물에서 인슐린 치료가 만성 합병증의 진행에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 2형

당뇨 모델 쥐에서의 신장과 대혈관에서의 치료에 따른 만성 합병증의 진행 병변을 관찰하고 특히 신경전도검사를 시행 함으로써 인슐린 치료가 당뇨병성 신경증의 기능적 손실에 어떠한 영향을 주는지 확인하고자 하였다. 이에 그 원인인 고혈당에 대한 적극적인 치료가 신경증의 진행에 미치는 영향을 살피고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물 및 사육방법

한국 오츠카 제약회사에서 4주령에 기증 받은 OLETF 쥐를 대상으로 하였다. 동물의 사육은 12:12시간 명암 주기로 음식과 물을 원하는 대로 제공하였다. 각 동물은 36주령에서 경구 당부하검사를 시행하여 당뇨병으로 판정된 쥐 19마리를 각각 6주군 10마리(대조군 3마리, 경구약제 3마리, 인슐린 4마리)와 14주군 10마리(대조군 3마리, 경구약제 3마리, 인슐린군 4마리)치료군으로 분류하였다. 각 군에서 음식과 물을 원하는 대로 제공하는 대조군 3마리와 경구 약제로 치료하는 경구약제군 3마리 및 인슐린으로 치료하는 인슐린군 4마리로 세분하였다. 6주치료군 중 인슐린 치료군 중 1마리는 치료 4주째 사망하였다.

### 2. 혈당 관리

OLETF 쥐의 혈당 관리는 대조군에선 치료 없이 물과 음식을 원하는 대로 제공하였으며 경구 약제군에선 경구용 혈당강하제인 glibenclamide 5 mg/kg의 용량으로 2% Tween-80 (Merck, Darmstadt, Germany)와 0.9% 생리 식염수를 함께 섞어 2.5 ml/kg를 섭식관을 통해 경구 주입하였다. 인슐린군에서는 novolin N을 하루에 8단위의 용량으로 오후 4시경에 피하 주사를 하였다. 인슐린군의 경우는 대사적 사육상자에서 격주로 1일간 사육하면서 24시간 소변을 모아 uriscan (영동제약)으로 요당과 요단백을 측정하였고 대조군과 경구 약제군에선 1달에 1회 상기 방법으로 요당을 측정하였다.

### 3. 체중 및 경구 당부하검사에 의한 혈당과 인슐린 분비능 측정

주령 20주에 경구 당부하 검사를 시행하여 당뇨를

진단받은 19마리의 OLETF 쥐에서 실험이 시작되는 36주령과 42주령과 50주령에 각각 경구 당부하 검사를 시행하였다. 우선 밀폐된 사육상자에서 에테르를 사용하여 1분간 마취시킨 뒤에 꼬리 정맥에서 23 gauge 바늘을 사용하여 1 cc정도의 혈액을 미세 시험관 (microtube)에 채혈하고 헤파린용액 (1:10000) 1 cc를 투여한 뒤 헤파린 lock을 사용하여 혈관을 확보하였다. 이후에 2 g/kg용량의 50% 포도당용액을 섭식관을 통해 경구 투여하였다. 경구 당부하 각각 1시간과 2시간 뒤에 혈액을 각각 1 cc정도 채혈하였다. 채혈한 혈액을 20분간 4℃에서 2500 rpm으로 원심 분리한 후에 혈당 분석기 (Beckman, Stockholm, Sweden)으로 분석하였다. 당뇨병의 진단은 경구 당부하검사상 최고 혈당수치가 16.6 mol/dL (300 mg/dL) 이상이고 2시간 후 혈당이 11.1 mol/dL (200 mg/dL) 이상인 경우 당뇨로 진단하였고 이중 1개를 만족한 경우 내당능 장애로 진단하였다. 이 진단법은 OLETF 및 STZ 유발된 당뇨쥐에서 적용하는 진단기준을 사용하였다<sup>8)</sup>. 또한 이 혈액을 가지고 쥐의 인슐린 항체측정 방법을 이용하여(Linco, MO, USA) 인슐린 분비능을 측정하였다. 치료 6주군 9마리와 14주군 10마리도 상기 방법으로 경구 당부하검사를 시행하고 이의 혈당치와 인슐린 치를 측정하였다.

### 4. 신경 전도 검사<sup>9)</sup>

1) 각 6주와 14주간 치료 후 치료가 끝나는 시점인 6주치료 후 (42주령)와 14주 치료 후 (50주령) 에 모든 OLETF 쥐들에서 urethane (Merk, Darmstadt, Germany) 1 mg/kg 용량으로 복강내 주입하여 마취하고 직장 내 체온은 homeostatic blanket (Harvard Apparatus Co Inc, Millis, Mass, USA)을 사용하여 37℃를 유지시켰다.

2) 비복 신경을 박리하기 위해 족부후방의 피부와 근육층을 절개하여 그 주위의 조직에서 좌골신경을 박리한 뒤 그 가지인 비복신경과 총비골 신경을 노출시켰다. 쥐는 고정기 (fixer)로 분리된 피부층을 고정장치에 5군데를 바늘로 꿰어 실로 당기어 고정 장치로 고정하였다. 이후 피부가 당겨지게 만든 뒤에 노출된 신경의 건조를 방지하기 위해 피부층과 근육층을 분리한 공간을 mineral oil 20~30 cc 정도로 채운 뒤 미세 현미경하

에서 미세 수술 도구로 근막까지 완전하게 박리 하였다.

3) 신경을 자극하기 위해 비복신경에 한쌍의 platinum bipolar 자극 전극 (stimulating electrode)을 장치하고 좌골 신경 수준에서 감지 전극 (recording electrode)을 장치하였다. 이후 측정이 끝난 뒤에 다시 총비골 신경에 자극 전극을 장치하고 좌골신경에서 감지 전극을 장치하여 측정하였다.

4) 매번 측정시 최고 유발 전위 진폭과 그때의 역치로 최대 진폭시 자극세기를 측정하였다.

5) 신경 유발 전위를 발생하는 자극의 세기는 10  $\mu$ sec의 자극 기간부터 시작하여 100  $\mu$ sec, 500  $\mu$ sec의 기간 동안 자극을 가하여 A 섬유에 최대 유발 전위 진폭 (peak amplitude)이 나타나기 시작하는 자극 세기를 역치 (threshold)로 정하여 각각을 측정하였다. 자극은 각각의 신경에 대하여 30회 정도의 자극을 주고 그 반응을 평균하여 진폭을 측정하였다.

6) 자극속도가 빠른 A 섬유의 특성을 분석하기 위해 자극 기간을 주로 10  $\mu$ sec으로 하여 최대 유발 전위가 나타난 시점에서의 자극 강도에 10배정도의 강도로 30회 정도 자극 후 나타난 반응을 평균하여 A-섬유 활동도를 측정하였다.

7) 이렇게 신경 전도 검사는 치료 6주를 시행한 9마리의 경우는 치료 6주가 끝난뒤에 (42주령) 시행하였고 각각 3회씩 시행하여 평균치를 내었고 치료 14주를 시행한 10마리의 경우는 치료 14주가 모두 끝난 뒤인 50주령에 시행되었다.

## 5. 혈관 내막 관찰

1) 경동맥이 축진되는 1 cm 측방으로 세로의 절개선을 가하고 근육층을 분리한 뒤 경정맥과 경동맥을 분리하였다.

2) 경동맥의 심장 기시부까지 분리하여 심장 기시 1 cm, 3 cm에서 5 mm 크기로 잘게 분리하였다.

3) HE 염색과 elastin 염색을 시행하고 형태 분석기로 각각의 내경의 4군데를 측정한 평균값으로 내막 두께를 측정하였다 (LM 10 $\times$ 40).

## 6. 신장 조직의 관찰

신장조직을 1 $\times$ 0.5 $\times$ 0.5 cm<sup>3</sup>의 크기로 분리하여 HE

염색과 PAS 염색을 사용하여 사구체 경화정도를 비교하였다 (LM 10 $\times$ 40).

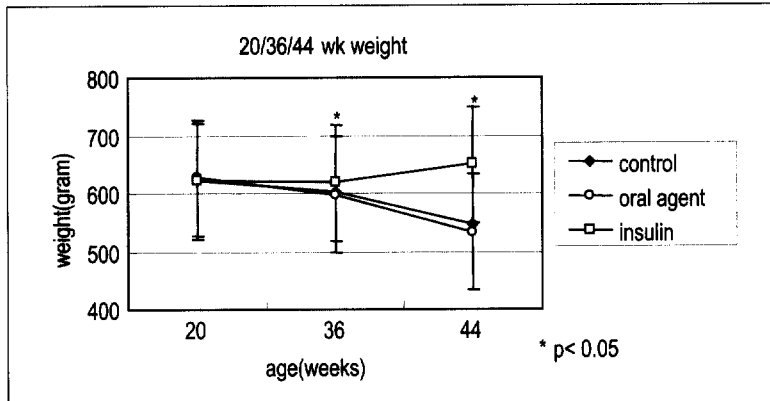
## 7. 자료 및 통계

연구결과들은 평균 $\pm$ 표준 편차로 표기하였고 각 군간의 결과는 비모수 통계법을 사용하여 검증하였으며 통계적 유의성은 p<0.05로 정하였다.

## 결 과

20주에 시행한 경구 당부하검사에서 대상하는 모든 OLETF 쥐에서 모두 당뇨병발을 확인할 수 있었고 이후 36주에 시행한 경구 당부하 검사상에서도 20마리 모두 당뇨로 진단되었으나 이 경우 혈당곡선하면적 (GAUC: glucose area under the curve)의 결과는 세 군간에 유의한 차이를 나타내지 않았다 (대조군: 814 $\pm$ 57 mg/dL, 경구 약제군 824 $\pm$ 42 mg/dL, 인슐린군 811 $\pm$ 69 mg/dL). 하지만 치료 6주 후인 42주령부터는 6주 치료 후에 시행한 경구 당부하 검사상 혈중 포도당 곡선하면적은 대조군에 비해 약제군과 인슐린군에서 혈중 포도당 곡선하면적치의 의미있는 감소를 보였다 (대조군 GAUC 837 $\pm$ 101 mg/dL, 경구 약제군 GAUC 743 $\pm$ 77 mg/dL, 인슐린군 GAUC 703 $\pm$ 55 mg/dL, p < 0.05). 또한 14주 치료후인 50주에서의 경구 당부하 검사상 혈중 포도당 곡선하면적치는 (14주 치료군, 대조군 GAUC 907 $\pm$ 34 mg/dL, 경구 약제군 GAUC 771 $\pm$ 48 mg/dL, 인슐린군 GAUC 776 $\pm$ 87 mg/dL, p < 0.05)으로 치료군에서 대조군에 비해 유의하게 낮은 혈중 포도당값을 나타내었다. 또한 체중의 변화는 인슐린군에서 치료 6주 (740 g)와 14주 (790 g)에 다른 두 군에 (대조군: 6주: 555 $\pm$ 56 g, 14주: 500 $\pm$ 45 g, 경구 약제군: 6주: 573 $\pm$ 48 g, 14주: 573 $\pm$ 64 g) 비하여 유의한 증가를 보였다 (p<0.05) (Fig. 1)

36주에 시행한 경구 당 부하 검사상 나타난 인슐린 분비능에서는 모두에서 인슐린 분비능의 저하가 관찰되었고 세 군간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 하지만 6주 치료후인 42주령에는 인슐린군에서 유의하게 높은 인슐린곡선하면적의 결과가 나타났다 (대조군 IAUC 2.01 ng/dL, 경구 약제군 IAUC 2.46 ng/dL, 인



**Fig. 1.** Body weight change

Change of body weight in the insulin - treated group at the 44 week.  
(\*compare with OHA vs. Insulin  $p < 0.05$ ).

**Table. 1.** Threshold of Sural Nerve after 6weeks Treatment

There are no Significant Differences in three Groups ( $n=3$ )( $p>0.05$ )

	CONTROL	OHA	INSULIN
Mean±SD	1.09±2.36	0.68±0.23	0.50±2.05

**Table. 2.** Threshold of Common Peroneal Nerve after 6weeks Treatment

There are no Significant Differences in three Groups ( $n=3$ )( $p>0.05$ )

#OHA: Oral Hypoglycemic Agent

	CONTROL	OHA	INSULIN
Mean±SD	1.56±0.52	1.11±0.20	0.76±0.15

슐린군 IAUC 3.73 ng/dL,  $p < 0.05$ ). 또한 14주 치료 후의 기저 인슐린치 및 인슐린면적하곡선은 대조군과 경구 약제군에서는 심하게 저하되어 인슐린 치료군에 비해 유의하게 낮았다(14주 치료군, 대조군 IAUC 0.89 ng/dL, 경구 약제군 IAUC 1.73 ng/dL, 인슐린군 IAUC 9.58 ng/dL,  $p < 0.01$ ). 하지만 인슐린군에서도 경구 당부하 후 시간에 따른 인슐린 분비능의 증가는 관찰되지 않았다(인슐린군 0hr 6.415 ng/dL, 1hr 4.24 ng/dL, 2hr 4.28 ng/dL).

치료에 따른 혈당 조절의 지표로 사용한 24시간 소변 검사상 요당은 대조군과 경구 약제군에서는 진단 Stick에서 계속 4+로 1그램 이상의 단백뇨로 확인되어

나오는 반면 인슐린군에서는 치료 3일 뒤부터 격주로 시행한 검사상 요당이 측정되지 않았고, 단백뇨는 대조군, 경구 약제군, 인슐린군 모두에서 38주, 42주, 46주 및 50주에 uriscan 상 4+로 단백뇨가 지속적으로 측정되었다.

신경 전도 검사상 6주 치료 시에 인슐린군은 비복 신경(0.50 mA)과 총 비골신경(0.76 mA)에서 다른 두 군에 비해(대조군: 1.09 mA/1.56 mA, 경구 약제군: 0.67 mA/1.11 mA) 모두 가장 낮은 역치를 나타냈으나 통계적 의의는 없었다( $p > 0.05$ )(Table. 1, 2).

신경전도 검사상 감각 신경인 비복 신경에서 14주 치료시에 인슐린군은 대조군과 경구 약제군보다 최대

**Fig. 2.** Threshold and peak amplitude of sural nerve after 14weeks In insulin treatment group, there was higher amplitude at lower threshold ( $p<0.05$ ).

**Fig. 3.** Threshold and peak amplitude of common peroneal nerve after 14weeks treatment. In insulin treatment group, there was higher amplitude at lower threshold than control or OHA (\*\*  $p<0.05$  compare control vs. Insulin). Control: no treatment, OHA: oral hypoglycemic agent Tx, Insulin: insulin Tx

유발 전위의 진폭이 유의하게 높았고 (대조군:  $3.79 \text{ mV} \pm 0.83$ , 경구 약제군:  $3.92 \pm 0.72 \text{ mV}$ , 인슐린군:  $6.43 \pm 0.50 \text{ mV}$ ,  $p<0.05$ ) 이를 발생시키는 자극세기의 역치는 인슐린군에서 (대조군:  $3.88 \pm 1.02 \text{ mA}$ , 경구 약제

군:  $2.51 \pm 0.37 \text{ mA}$ , 인슐린군:  $0.97 \pm 0.36 \text{ mA}$ ,  $p<0.05$ ) 가장 낮았다 (Fig. 2).

신경 전도 검사상 14주 치료 시에 운동 신경인 총 비골 신경에서도 인슐린군은 대조군과 경구 약제군보

**Fig. 4.** Intimal thickness of carotid artery after 14 week treatment. No significant change in three groups. (n=3)

다 최대 유발전위의 진폭이 유의하게 증가하였고(대조군:  $3.93 \pm 0.12$  mV, 경구 약제군:  $4.77 \pm 0.48$  mV, 인슐린군:  $5.95 \pm 0.88$  mV,  $p < 0.01$ ) 이를 나타내는 자극 역치는 인슐린군에서(대조군:  $4.54 \pm 1.15$  mA, 경구 약제군:  $2.93 \pm 0.15$  mA, 인슐린군  $1.10 \pm 0.49$  mA) 가장 낮았다(Fig. 3).

경동맥 내막의 두께는 대조군에서 가장 두꺼웠으나(대조군:  $7.60 \pm 1.89$  mm $\times 10^{-2}$ , 경구 약제군:  $6.11 \pm 4.14$  mm $\times 10^{-2}$ , 인슐린군:  $6.76 \pm 2.46$  mm $\times 10^{-2}$ )세 군 간에 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4, 5).

신장 조직의 경우는 모든 군에서 24시간 소변검사상 38주, 42주, 46주, 50주에 지속적 단백뇨가 4+ (>1 g/day)로 측정되었고 병리 조직상에 비슷한 경화조건이 관찰되었다(Fig. 6. A, B, C).

## 고 찰

본 연구는 당뇨가 충분히 발현된 당뇨쥐에서의 인슐린 분비능과 합병증에 대한 연구이다. 이번 실험 결과에서 살펴보면 첫째로 우선 당뇨가 병발하는 20주

**Fig. 5.** Intimal thickness of carotid artery. No significant change among three groups. Elastin stain, LM 10 $\times$ 40 (A: control, B: oral agent, C: insulin).

및 당뇨가 진행된 상태의 36주에 시행한 경구 당부하 검사의 혈중 포도당 및 인슐린치의 결과는 대조군과 경구 약제군 및 인슐린군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고, 모두 당뇨가 진단되었다. 하지만 치료 6주 및 14주의 경구 당부하 검사상 경구치료 및 인

고 반면 경구 약제군과 대조군에서는 계속 요당이 4+로 측정되었다. 이로써 인슐린군에서의 하루 1회 투여한 인슐린치료가 혈당의 조절에 비교적 효과적인 영향을 주었다고 생각할 수 있었다.

둘째로 인슐린 분비능은 36주령 이후 부터 저하되어 36주에 측정한 결과 세 군 모두에서 기저 인슐린 분비능이 저하되어 있었다. 특히 14주 치료 후 50주령의 인슐린군에서는 기저 인슐린치 및 인슐린극선하면적이 높게 측정되었으나 자극에 대한 분비능은 증가되지 않았다. 기존의 다른 연구<sup>9)</sup>의 결과에선 OLETF 음성 쥐에서 55주령까지는 대조군으로 사용되는 LETO의 분비능에 비해 통계적으로 유의하게 높은 인슐린 농도를 나타냈고 65주령에서야 요당의 검출이 심해지면서 체중감소와 인슐린 분비능의 저하를 나타내었다. 본 연구에서는 연구 시작 시점인 36주령부터 OLETF 음성쥐에서 인슐린 분비능이 저하된 것으로 나타났는데 아마도 이는 각 군을 선정할때 각 군에 선정된 쥐의 수가 제한적이었고 기존 연구에 사용하였던 쥐보다 비만도가 낮은 집단이었고 쥐의 체중의 감소가 일찍 시작된 집단으로 이런 집단의 경우 기저 인슐린 분비능이 절대적으로 낮으리라 생각되며 분비능의 저하도 더 일찍 진행되었으리라 사료된다. 또한 6주 인슐린 치료군에서 기저 인슐린치가 높게 측정된 이유로는 실험에서 사용된 인슐린 면역측정법의 인슐린 항체는 쥐 인슐린에 비특이적인 것으로 어느 정도 파하로 투여된 인간형 인슐린과 교차반응에 의한 것으로 생각된다<sup>10)</sup>. 상기 결과에서 주로 인슐린저항성이 병인으로 설명되는 OLETF 쥐의 경우도 환경과 치료에 따라 당뇨가 진행되면서 그 양상이 인슐린저항이 특징인 2형 당뇨 양상에서 다소 차이가 나는 인슐린 분비거 감소되는 한국형 1.5형 당뇨로 특징이 전환되어감을 알 수 있었다. 기존의 연구에서는 OLETF의 경우 당뇨가 병발하면서 요당이 발생하며 55주 이상 지나면 췌도세포의 섬유화 및 인슐린 분비능의 저하로 인슐린치료만이 혈당의 조절에 효과가 있다고 하였다. 본 실험에서도 인슐린을 사용한 군에서만 요당의 검출이 음성이었고 이로써 혈당 조절에 대한 인슐린의 효과를 확인할 수 있었다.

이와 함께 인슐린군에서 체중증가의 효과도 관찰할

**Fig. 6.** Kidney pathology. Diffuse glomerulosclerosis observed in all three groups. PAS stain, LM 10×40 (A: control, B: oral agent, C: Insulin).

슐린군에서 대조군의 혈중 포도당극선하면적 (GAUC) 및 인슐린극선하면적 (IAUC)에서 유의한 혈당저하와 분비능의 차이를 확인할 수 있었다. 그러나, 혈중 포도당 자극에 대한 인슐린 분비능은 모든 군에서 소실된 것을 알 수 있었다. 또한 24시간 요당 검사상에서의 결과에서는 치료시작 36주령의 모든 쥐에서의 요 검사상 요당이 4+가 나타났으나 치료 6주 및 14주 후의 인슐린군에서는 지속적으로 요당이 전혀 검출되지 않았



수 있었다. 다른 보고등<sup>6)</sup>은 OLETF 쥐의 경우 대조군인 LETO 쥐에 비해 생후 5주부터 40주경에는 200 g 이상 몸무게의 증가가 유의하게 많으나 당뇨가 병발하여 심해지는 55주경에는 요당의 검출과 몸무게의 감소가 나타나고 당뇨의 정도와 인슐린 분비능의 저하가 심해지는 것을 보고했다. 이때 인슐린 치료가 요당의 검출을 방지하며 체중의 증가도 가져오는 것을 보고한 바 있다. 인슐린군에서 나타난 유의한 체중 증가는 혈당의 조절과 체중의 증가는 상관관계를 나타낸다고 사료되어진다<sup>12)</sup>.

셋째로 14주 치료후 시행한 당뇨병성 신경증검사에서 인슐린치료군에서 감각신경 뿐만 아니라 운동신경에서도 신경전도검사상 낮은 자극의 역치로 최대 유발전위진폭을 나타내어 자극에 민감하게 반응하였는데 이 결과는 당뇨병성 신경증의 기능적 완화를 나타내는 소견이다. 기존의 연구되었던 당뇨병성 신경증 검사의 동물 모델로는 1형 당뇨의 예로 자연적으로 당뇨가 병발하는 BB/W 쥐를 사용하여 이 경우에 심한 형태학적 변화 및 NCV저하 및 유발전위진폭 감소가 관찰되었다. I형과 II형 당뇨의 중간 모델인 STZ 쥐의 경우는 구조 변화보다는 기능적 이상이 주로 관찰되었고 II형 당뇨의 모델로는 db/db mouse나 WKY/Ncp 쥐의 경우는 운동 NCV의 저하와 함께 경한 형태학적 변화 소견이 관찰되었다<sup>13,14,15,16)</sup>. 본 연구에서는 제2형 당뇨 모델로 신경증에 대한 신경 전도 검사에서 인슐린군에서 치료후 운동 및 감각신경의 기능 완화를 발견하였다. 이는 신경증의 기전으로는 첫째 polyol pathway 및 최근 연구에서보면 이렇게 당뇨 조절의 목적으로 사용된 인슐린 자체가 신경세포 퇴화 방지에 도움이 된다는 모고도 있었다.

넷째로 당뇨병성 신증에 대한 연구는 36주부터 시행한 24시간 요단백량의 검사에서는 치료군, 대조군 모두에서 24시간 동안의 소변에서 dipstick을 사용한 요단백 검사상 4+ 소견으로 대략 하루 1g 이상의 요단백이 측정되는 것으로 생각되었다. 또한 세 군 모두에서 당뇨병성 신증의 특징적인 결절성 병변 및 경화성 병변이 특수 염색인 PAS염색법에서 양성 침착물이 관찰되었으며 특히 전반적인 사구체 경화가 관찰되었고 세 군간에 병리 조직학적인 유의한 차이는 관찰되

지 않았다. 다른 보고<sup>7)</sup>에서도 이러한 조직학적 소견이 관찰되었고 이는 사람의 경우 인간 당뇨병성 신사구체 경화증에서 보여지는 삼출성 병변인 fibrin cap (유리질: hyaline)과 유사한 것으로 나타난다. 본 연구결과에서는 당뇨병성 신증이 미세 단백뇨가 아닌 거대 단백뇨로 진행되는 경우는 인슐린치료를 의한 혈당의 조절이 신장의 병변의 차이나 단백뇨량의 차이에는 영향을 끼치지 못한 결과를 나타냈다. 아마도 36주경에는 당뇨의 만성 신장 합병증은 이미 진행된 상태로 이 당시 하루 요단백 3+ 이상 검출되고 있었다. 이에 대한 최근 보고서에 따르면 초기 당뇨에서 식이 조절로 단백질 제한과 혈압조절 및 혈당 조절을 시행할 경우는 요단백 검출의 감소와 사구체 손상 정도가 약화되는 것을 보고한 바 있지만<sup>3,4)</sup> 이는 초기 당뇨병 진행시기에 적용되는 것이고 진행성 합병증이 병발된 경우는 인슐린 치료가 당뇨병성 신증의 병리적 소견에 영향을 주지 않는다고 생각된다.

다섯째로 경동맥 내막두께는 인슐린의 단기(6주) 및 장기(14주) 투여의 경우 각 세 군간에 유의한 차이를 보이지는 않았다. 대개의 경우 인슐린치료후 대혈관 합병증에 대한 예측으로 대개 초음파를 통한 경동맥 내막두께를 측정하는데 인슐린저항성이 있는 경우에는 대혈관 합병증의 발생률이 높으며 이 경우 다른 위험 요인(고혈압, 고지질혈증)등으로 심장의 관상동맥 질환에 대한 합병증의 위험도가 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 간접적인 초음파가 아닌 경동맥을 직접 분리하여 내경을 측정하므로써 보다 정확한 대혈관 내막 두께를 측정할 수 있었다. 이번 결과는 진행성 당뇨병의 36주령의 OLETF 웅성 쥐에서 대조군, 경구 약제군, 인슐린군의 경우 대혈관에 죽상 경화증의 진행정도는 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 나타났다. 하지만 대상 개체가 적었고 기존 대상군보다 비만도나 인슐린 분비능이 낮은 집단이었기 때문에 인슐린 치료가 대혈관 합병증에 대한 위험도를 따지기에는 좀 더 많은 수의 개체와 평균 비만도와 인슐린 분비능을 지닌 군에서의 연구가 필요하리라 사료된다.

본 실험에서 사용된 OLETF 웅성쥐의 경우는 인슐린저항성을 나타내는 2형 당뇨의 모델로서 사용되어

하지만 당뇨의 합병증이 발생되고 당뇨가 진행됨에 따라 36주 이후에는 체중이 감소되며 인슐린의 분비능이 저하되는 1형 당뇨의 모델로 그 특성이 바뀌지는 것을 알 수 있었다. 이 경우는 인슐린의 분비와 저항성에 도움이 되는 설폰요소계의 경구용 혈당강하제의 경우는 혈당 자체에는 다소 효과가 있었으나 인슐린 분비능 강화나 합병증의 진행 완화에는 효과가 거의 없었으며 인슐린에 의한 치료는 혈당 조절 및 요당 감소와 진행된 신경증의 기능적 완화에 도움이 되었음을 알 수 있었다. 이와 함께 인슐린사용으로 인한 체중 증가와 거대 혈관 합병증의 진행에 대하여 비교한 결과에서는 체중의 경우 인슐린 투여군에서 다른 군보다 통계학적으로 의미 있게 증가되었으나 거대 혈관 합병증의 지표인 경동맥 내막의 두께는 각 군간의 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 인슐린 치료에 따른 연구는 차 후에 더 많은 대상군에서의 연구가 필요하리라 사료된다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 제2형 당뇨에서 인슐린 분비능이 저하되는 시기에는 인슐린 투여가 요당 감소와 체중 증가 및 신경증의 발생을 지연에 도움이 되리라 사료된다.

## 요 약

**연구배경:** 연구자는 인슐린 분비능이 저하된 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat) 웅성 쥐에서 인슐린 치료 및 경구 혈당강하제 사용이 당뇨병성 신경증 및 대혈관과 신장조직에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법:** OLETF 웅성쥐를 각각 대조군, 경구용 혈당 강하제 치료군, 인슐린 치료군으로 6주와 14주간 치료한 후에 체중 측정후 신경전도 검사를 시행하고 신장과 경동맥을 분리하여 조직학적 형태를 비교하였다.

**결과:** 1. 치료군 모두에서 혈중 포도당치는 통계적으로 치료시 대조군보다 의미있는 차이를 나타내었다. 특히 14주 치료군에선 대조군 GAUC  $50.4 \pm 3.2$  mol/L, 경구 약제군 GAUC  $42.9 \pm 3.1$  mol/L, 인슐린군 GAUC  $43.1 \pm 3.4$  mol/L,  $p < 0.05$ 로 나타났다.

2. 인슐린 분비능은 14주 인슐린 치료군에서 인슐

린곡선하곡선의 유의한 증가가 관찰되었으나(대조군 IAUC 0hr 0.89 ng/dL, 경구 약제군 IAUC 1.73 ng/dL, 인슐린군 IAUC 9.58 ng/dL,  $p < 0.01$ ) 혈중 포도당 부하 자극에 대한 시간에 따른 인슐린 분비능은 관찰되지 않았다(인슐린군 0hr 6.415 ng/dL, 1hr 4.24 ng/dL, 2hr 4.28 ng/dL).

3. 연구 기간동안 인슐린 치료군에서 유의한 체중의 증가를 보였다.

4. 신경전도 검사 소견은 치료 6주 시기에는 세 군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나 치료 14주 시기에는 인슐린 치료군에서 신경 복합 전위의 자극 역치가 유의하게 낮았고(비복신경의 역치; 대조군  $3.88 \pm 1.02$  mA, 경구 약제군  $2.51 \pm 0.37$  mA, 인슐린군  $0.97 \pm 0.36$  mA; 총비골신경의 역치; 대조군  $4.54 \pm 1.15$  mA, 경구 약제군  $2.93 \pm 0.15$  mA, 인슐린군  $1.10 \pm 0.49$  mA,  $p < 0.02$ ) 이에 반해 경구 약제군에서는 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다.

5. 치료 14주에 최대 유발전위(evoked potential peak amplitude)의 진폭은 인슐린 치료군에서 유의하게 높았다(비복신경; 대조군  $3.79 \pm 0.83$  mV, 경구 약제군  $3.92 \pm 0.72$  mV, 인슐린군  $6.43 \pm 0.50$  mA; 총비골신경; 대조군  $3.93 \pm 0.12$  mV, 경구 약제군  $4.77 \pm 0.48$  mV, 인슐린군  $5.95 \pm 0.88$  mA,  $p < 0.01$ ). 이에 반해 경구 약제군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

6. 연구 기간 동안 경동맥내막과 신장 조직의 변화는 세군간에 유의한 차이가 없었다.

**결론:** 말기 당뇨병성 합병증이 생긴 자연발생형 OLETF 웅성 쥐에서 38주 경부터는 체중 감소와 함께 인슐린의 분비능이 저하되며 이 경우 인슐린치료가 당뇨병성 신경증의 진행을 지연시킬 수 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 민헌기: 한국인 당뇨병의 임상적 특성. 당뇨병 16: 163-174, 1992
2. 이병욱, 윤현구, 양인명, 김진우, 김영실, 김광원, 김선우 등: 인슐린비의존형 당뇨병 환자에서 인슐린 치료후 인슐린 분비능의 변화. 당뇨병 9:217-

222, 1985

3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med* 329:977-986, 1993
4. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, et al: *Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with noninsulin dependent diabetes mellitus; a randomized prospective 6-year study. Diab Res Clin Pract* 28:103-117, 1995
5. UKPDS Group: *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet* 352:837-853, 1998
6. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Notori T: *OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) rat; a new NIDDM rat strain. Diab Res Clin Pract* 24(Suppl):317-320, 1994
7. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Notori T: *Spontaneously diabetic rat "OLETF" as a model for NIDDM in humans. In Frontiers in animal Diabetic Reserch. Lesson from Animal Diabetes II(ed. Shafir E Boston Birkhauser pp225-236, 1996*
8. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Notori T: *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. Diabetes* 41:1432-1438, 1992
9. Okauchi N, Mizuno A, Zhu M, Ishida K, Sano T, Noma Y, Shima K: *Effect of obesity and inheritance on the development of noninsulin - dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats. Diab Res Clin Pract* 29:1-10, 1995
10. Okauchi N, Mizuno A, Yoshimoto S, Zhu M, Sano T, Shima K: *Is caloric restriction effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus? Diabetes Res Clin Pract* 27:97-106, 1995
11. Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, Moon CH, Park SH, Park KA: *Low dose of NGF improved sensory function in streptozotocin induced diabetic rat. Exp Neurobiol* 7:59-67, 1998
12. Johansson BL, Bory K, Fernquist Forbes E, Odergren T, Remaht S, Wahren J: *C-peptide improves autonomic nerve function in patients with type 1 diabetes. Diabetologia* 39:687-695, 1996
13. Yagihashi S: *Pathology and pathogenetic mechanism of diabetic neuropathy. Diab Metabol Rev* 11:193-225, 1995
14. Yagihashi S, Kamijo M, Nagai K: *Peripheral neuropathy in diabetic animals. In Frontiers in Diabetic research. Lessons from animal diabetes 3: heterogenous expression of neuropathic patterns in different animal models (ed. Shafir E). London Smith Gordon pp459-463, 1991*
15. Sharma AK, Richard PA: *Diabetic neuropathy in various animal models. In Frontiers in animal diabetes Research: Chronic complication in diabetes (ed. Sima AAF) Amsterdam, Harwood Acad, 1999, pp 131-165* 14. Sima AAF, *Experimental diabetic neuropathy: an update, Diabetologia* 42:773-788, 1999
16. Sima AAF, Ristic H, Merry A, Kanijo M, Lattimer SA, Stevens MJ, Greene DA: *The primary preventional and secondary interventative effects of acetyl-L-carnitine on diabetic neuropathy in the BB/W-rat. J Clin Invest* 97: 1990-1907, 1996