

뇌조직의 리포푸신, 아세틸콜린 및 그 관련효소 활성화에 미치는 누에분말의 영향

최진호*·김대익·박수현·김정민·조원기¹·이희삼²·류강선²

부경대학교 식품생명공학부 생화학교실, ¹조아제약(주)
²농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

Effects of Silkworm (*Bombyx mori* L.) Powder on Lipofuscin, Acetylcholine and Its Related Enzyme Activities in Brain of SD Rats

Jin-Ho Choi*, Dae-Ik Kim, Soo-Hyun Park, Jung-Min Kim, Weon-Ki Cho¹,
Heui-Sam Lee² and kang Sun Ryu²

Lab. Biochemistry, Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University

¹Choa Pharmacy Co. Ltd, Seoul Korea

²Dept. of Sericulture & Entomology, National Institute of Agricultural Science & Technology,
RDA, Suwon 441-100, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the effect of silkworm (*Bombyx mori* L.) powder on lipofuscin, acetylcholine (ACh) and its related enzyme activities in brain of rats. Sprague-Dawley (SD) male rats (160±10 g) were fed basic diet (control group), and experimental diets (SWP-200 and SWP-400 groups) added 200 and 400 mg/kg BW/day for 6 weeks. In case of liver membranes, lipofuscin (LF) levels resulted in a slight decreases (4.6% and 11.5%, respectively) in SWP-200 and SWP-400 groups compared with control group. But in case of brain as the most sensitive organ, LF levels were remarkably inhibited about 16.7% and 20.0% in SWP-200 and SWP-400 groups compared with control group. There were no significant differences in acetylcholine (ACh) syntheses as a very important neurotransmitter, and choline acetyltransferase (ChAT) activities as a synthesis enzyme of ACh, and acetylcholinesterase (AChE) activities as a hydrolysis enzyme, which were concerned in transmission of neuron through synapses in brain of SWP-200 and SWP-400 groups compared with control group. Monoamine oxidase-B (MAO-B) activities were significantly inhibited (about 10.2%) in brain of SWP-400 groups compared with control group. These results suggest that inhibiting effects of LF accumulation and MAO-B activity of silkworm powder (SWP) may play a pivotal role in attenuating a various age-related changes for improvement of brain function.

Key Words – Silkworm (*Bombyx mori* L.) powder, Acetylcholine (ACh), Acetylcholinesterase (AChE), choline acetyltransferase (ChAT), Monoamine oxidase-B (MAO-B), Lipofuscin (LF)

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 051-620-6332, Fax : 051-628-6343

E-mail : jhchoi@pknu.ac.kr

서 론

최근 Dia-D라는 상품으로 누에가루로써 개발한 함당노음료[7, 8]가 국내외에 특허출원되면서 누에가루의 생화학적 생리작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 누에(*Bombyx mori* L.)는 누에나방과(Bombycidae)에 속하는 유충(幼蟲)으로서 《신농본초경(神農本草經)》의 중품에 수재되어 있고, “白僵蠶은 小兒의 驚癇, 夜啼를 治療하고 二蟲을 제거하며... 또 顏色에 좋고 특히 男子의 陰痒病에 좋다”는 기록이 있다. 이시진의 《본초강목(本草綱目)》에도 “僵蠶은 蠶이 風病에 걸린 것으로서, 風을 다스리고 痰을 부드럽게 하고 結을 발산하며 經을 行할 수 있다”고 하여 현대인의 성인병에 매우 좋을 것이란 사실을 암시하고 있다[19]. Odaka 등[20]은 이당류수해효소저해제(AO-128)을 이용한 고혈당억제효과, Cho 등[1]은 당뇨병자들의 민간요법 실태조사, 누에가루의 임상연구에서 만성 간염환자의 29%, 간경화증 환자 62%의 치료효과[23], 인슐린 비의존형(Type II) 당뇨병자에게 하루 누에분말 500 mg을 투여했을 때 65%의 혈당강하효과[2]. α -glucosidase활성의 억제작용에 의한 누에분말의 혈당강하효과[10, 11], 누에분말의 제조조건 및 투여조건에 따른 혈당 강하효과[17, 22], 누에분말의 항종양효과[21] 등이 보고되어 있을 정도다.

따라서 누에분말을 비롯하여 뽕잎 추출물, 실크 피브로인의 활성산소 및 제거효소의 영향에 이어 누에분말과 당뇨병 치료제로서 한독약품(주)의 다오닐(Daonile : glibenclamide)과 비교하여 대등한 효과를 갖는 기능성 함당노음료로서 Dia-D를 개발하여 특허출원[7, 8] 중에 있다. 본 연구는 누에성분의 생리활성연구의 일환으로서 전보[9]에 이어 뇌조직의 리포푸신, 아세틸콜린 및 그 관련효소에 미치는 누에분말의 영향을 분석, 유의적인 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

동물실험 및 사료조성

한국화학연구소에서 구입한 Sprague Dawley계 랫트(male, 160±10 g)를 구입하여 본 대학 동물사육실에서 2주 동안 예비사육한 다음, 7마리씩 3군으로 나누어 실험용 기본사료(control group)로써 사육하면서 농촌진흥청 잠사곤

충부에서 5령 3주짜리 누에를 동결건조하여 제공한 누에(*Bombyx mori* L.) 가루를 각각 200 및 400 mg/kg BW가 되도록 사료에 첨가한 실험그룹(SWP-200 및 SWP-400 groups)으로 하여 6주간 사육실험을 행하여 리포푸신, 아세틸콜린 및 그 관련효소의 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. 동물사육실은 항온항습(22±2℃, 65±2% RH)하에서 12시간 사이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절된다.

조제사료의 조성

본 실험에 사용한 사료조성은 전보[5]와 같이 탄수화물 57.8%(α -corn starch: 44.5% + sucrose 13.3%), 단백질 16.0% (sodium-free casein), 지질 18.0% (lard 18.0%), 비타민과 무기질(AIN-76 mixture) 각각 1.0%, 3.5%, 그리고 섬유질 3.0%, DL-methionine 0.3%, choline chloride 0.2%를 첨가하였으며, 여기에 cholesterol 0.5% 및 sodium chloride 0.2%를 첨가하였다. 실험그룹의 사료조성은 누에가루(SWP)를 하루에 각각 200 및 400 mg/kg BW가 섭취되도록 0.2% 및 0.4%의 SWP를 첨가하는 대신 탄수화물을 각각 0.2% 및 0.4%씩 제외하고 조제하였다.

뇌세포 핵분의 분획

뇌세포의 분획은 저자 등[3]의 방법에 따라 균질 원충용액(1.15% KCl/10 mM phosphate buffer/5 mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 미토콘드리아, 마이크로솜 및 시토졸 핵분을 분획하여 사용하였다. 이들 핵분의 단백질의 함량은 Lowry 등[18] 방법에 따라 정량하였다.

리포푸신 함량의 측정

노화색소로서 리포푸신(lipofuscin)의 측정은 Fletcher 등[13]의 방법에 따라 조직의 표면에 과도한 수분과 오물을 제거한 후 뇌조직 0.2 g에 chloroform-methanol(2:1, v/v) 혼합용액 4.0 ml에 첨가 후 1분간 균질화시킨후 원심분리하여 chloroform층 2.0 ml를 분취하여 형광광도계를 사용, 345 nm(excitation)와 435 nm(emission)에서 표준용액(quinine sulfate μ g/ml of 0.1 N H₂SO₄)을 대조군으로 형광도를 측정하여 리포푸신의 함량(μ g/mg protein)을 정량하였다.

아세틸콜린의 함량 측정

아세틸콜린(acetylcholine: ACh)의 측정은 Galgani 등

[14]의 방법에 따라 alkaline hydroxyl-amine을 가진 *o*-acyl 유도물의 반응을 기초로 측정하였다. 모든 hydroxamic acid는 산용액에서 ferric ion과 결합하여 자주색을 나타낸다. 뇌회분 50 μ l를 취하여 1% hydroxylamine 50 μ l를 첨가, 혼합하여 HCl을 이용하여 pH를 1.2 ± 0.2 조절하였다. FeCl₃ (10% in 0.1 N HCl)을 500 μ l를 첨가 후 혼합하여 분광광도계를 이용하여 파장 530 nm에서 acetylcholine (ng/ mg protein)의 활성을 측정하였다.

아세틸콜린(ACh) 관련효소의 활성 측정

• 콜린아세틸트랜스퍼라아제(ChAT)의 활성

Ellman 등[12]의 방법에 의한 DTB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate)에 의한 기질로서 acetyl-CoA을 이용하여 반응을 생성하여 이 기질시약의 흡수가 감소하는 것을 이용한 방법으로 뇌세포의 회분의 콜린아세틸트랜스퍼라아제(choline acetyltransferase: ChAT)의 측정은 0.2 mM acetyl-CoA, 10 mM choline chloride, 0.2 M KCl, 10 mM potassium phosphate with 1 mM EDTA를 각각 0.2 ml씩 첨가-혼합하여 총 0.8 ml의 부피로 만든 다음 choline acetyltransferase를 1 μ l, cytosol 100 μ l, 1.0 M Tris buffer 190 μ l, DTB를 5 μ l, 20% TCA (trichloroacetic acid) 250 μ l의 양으로 각각 첨가-혼합하여 분광광도계를 이용해 파장 412 nm에서 2분 간격으로 ChAT의 활성을 측정하였다.

• 아세틸콜린에스테라아제(AChE)의 활성 측정

뇌세포에서 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE) 활성 측정은 Galgari 등[14]와 Hällak와 Giacobini[15]의 방법을 조합하여 측정하였다. 각 microplate well에 0.1 M Tris buffer, pH 8.0(Trizma HCl + Trizma base)을 300 μ l, 0.01M dithionitrobenzoic acid(DTNB) 20 μ l, enzyme suspension(상층액) 10 μ l을 연속적으로 첨가한다. 그리고 흡광도 측정직전에 기질시약인 0.1 M acetylthiocholine chloride 10 μ l을 첨가한다. Microplate reader (ELISA reader)를 이용하여 405 nm에서 흡광도 변화를 5분동안 관찰하여 AChE의 활성(unit/min/mg protein)을 측정하였다.

모노아민옥시다아제(MAO)의 활성 측정

모노아민옥시다아제(monoamineoxidase: MAO-B)의 활

성 측정은 Kalaria 등[16]의 방법에 따라 H₂O₂의 생성능을 기초로 측정하였다. 각 시험관에 100 mM Na-Pi buffer(pH 7.4)용액 460 μ l, 30 mM sodium azide용액 70 μ l, brain homogenates (mitochondria) 100 μ l를 넣은 후 기질시약인 10 mM benzylamine을 70 μ l을 넣으면서 37°C 항온수조에서 30분간 가온시킨다.

그리고 항온수조에서 시험관을 꺼내면서 1.8 mM 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) 500 μ l을 넣는다. 5초 후 저온상태로 보관되어 있는 5 units horseradish peroxidase 50 μ l을 넣는 동시에 5초간 잘 혼합시킨다. 10초가 지난 후 0.75 M hydrochloric acid containing 5% NaDodSO₄ (sodium dodecyl sulfate) 250 μ l을 각 시험관에 넣으면서 다시 5초간 잘 혼합시킨다. 기질시약인 10 mM benzylamine을 넣지 않은 blank를 대조로 하여 분광광도계를 이용하여 414 nm에서 흡광도를 측정하여 MAO-B 활성을 측정하였다.

분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test[24]로 실시하였다.

결과 및 고찰

리포푸신의 생성 억제효과

리포푸신(lipofuscin : LF)은 연령의 증가에 따라 얼굴 등 피부를 비롯한 여러 가지 장기에 침착하는 노화색소로 알려져 있기 때문에 LF의 생성량은 바로 노화의 지표로 사용되고 있다. 뇌조직중의 LF의 침착에 미치는 누에분말(SWP) 투여의 영향을 평가하여 보면 Table 1과 같다.

매우 민감한 뇌조직에서는 SWP-200 및 SWP-400 투여그룹의 LF의 생성량은 각각 1.00 ± 0.08 및 0.96 ± 0.06 μ g/mg protein으로서 대조그룹(1.20 ± 0.07 μ g/mg protein : 100%) 대비 83.3% 및 80.0%로서 누에분말의 투여에 의하여 각각 16.7% 및 20.0%의 매우 효과적인 LF의 축적 억제효과가 인정되었다. 그만큼 민감한 뇌조직에서 LF의 침착을 효과적으로 억제한다는 사실은 누에분말의 투여가 노화과정을 지연시키는데 중요한 의미를 갖는다고 기대할 수 있다.

Table 1. Effects of SWP on lipofuscin (LF) levels in brain membranes of SD rats for 6 weeks

	Control	SWP-200	SWP-400
Brain	1.20±0.07 ^a	1.00±0.08 ^{**} (83.3%) ^b	0.96±0.06 ^{***} (80.0%)

SWP-200 and SWP-400 : Silkworm powder of 200 and 400 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(ug/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001 compared with control group.

Table 2. Effect of SWP on acetylcholine (ACh) levels in brain homogenates of SD rats for 6 weeks

Control	SWP-200	SWP-400
36.12±3.10 ^a	36.21±2.05 (100.2%) ^b	36.73±3.04 (101.7%)

SWP-200 and SWP-400 : Silkworm powder of 200 and 400 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(ng/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values.

아세틸콜린(ACh)의 함량 변화

아세틸콜린(acetylcholine : ACh)은 뇌조직중에 존재하는 가장 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. 아세틸콜린의 생성에 미치는 누에분말 SWP-200 및 SWP-400 투여그룹의 영향을 비교하여 보면 Table 2에서 보는 바와 같다.

SWP-200 및 SWP-400 투여그룹에서 ACh의 함성은 36.21±2.05 및 36.73±3.04 ng/mg protein으로서 대조그룹(36.12±3.10 ng/mg protein : 100%) 대비 100.2% 및 101.7%로서 ACh의 함성에 거의 영향이 없었다. 따라서 누에분말의 단기간의 투여에서는 ACh의 생성에 아무런 영향도 주지 못한다는 사실을 알 수 있다.

ACh관련효소 활성화의 영향

그렇다면 ACh의 합성 및 분해에 관계하는 효소로서 콜린아세틸트랜스퍼라아제(choline acetyltransferase : ChAT) 및 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase : AChE)의 활성화는 누에분말 SWP-200 및 SWP-400의 투여에 의하여 어떤 영향을 받을 것인지 흥미로운 사실이 아닐 수 없다. ACh관련 두 가지 효소로서 ChAT 및 AChE의 효소활성에 미치는 누에분말 투여의 영향을 분석하여 보면 Table 3과 같다. ACh의 합성에 관계하는 ChAT의 활성을 비교하여 보면 SWP-200 및 SWP-400투여그룹에 의한 ChAT 활성

Table 3. Effects of SWP on choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholin-esterase (AChE) activities in brain of SD rats for 6 weeks

	Control	SWP-200	SWP-400
ChAT activity(unit/mg protein)	5.74±0.42a	5.78±0.61 (100.7%) ^b	5.83±0.39 (101.7%)
AChE activity(unit/mg protein/min)	251.0±16.9	250.2±16.3 (99.6%)	257.3±13.4 (102.5%)

SWP-200 and SWP-400 : Silkworm powder of 200 and 400 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD with 7 rats per group; ^bPercent of control values.

은 각각 5.78±0.61 및 5.83±0.39 unit/mg protein으로서 대조그룹(5.74±0.42 unit/mg protein : 100%) 대비 100.7% 및 101.7%로서 누에분말 투여에 의하여 거의 유의적인 증가효과를 발견할 수 없었다. 이러한 사실은 ACh의 함량 증가도 거의 기대할 수 없다고 사료된다.

또한 뇌조직의 시냅스(synapse)간의 신경전달에 깊이 관계하고 있는 AChE효소의 활성화에 미치는 누에분말의 투여효과를 비교하여 보면 SWP-200 및 SWP-400투여그룹의 AChE효소의 활성화는 각각 250.2±16.3 및 257.3±13.4 unit/mg protein/min으로서 대조그룹(251.0±16.9 unit/mg protein/min : 100%) 대비 99.6% 및 102.5%로서 누에분말의 투여에 의하여 SWP-400투여그룹에서 약간 증가하긴 했지만, 유의성은 인정할 수 없었다.

따라서 신경전달물질로서 아세틸콜린(ACh)을 합성하는 콜린아세틸트랜스퍼라아제(ChAT) 효소의 활성화도, 아세틸콜린에스테라아제(AChE)의 활성화도 누에분말의 투여에 의한 유의적인 효과를 관찰할 수 없었을 뿐만 아니라 ACh의 생성에도 아무런 효과가 없는 것으로 봐서 누에분말의 단기 투여는 뽕잎 추출물의 투여와 마찬가지로 신경전달물질의 변화에 거의 관계하지 않을 것으로 기대된다.

MAO-B효소활성의 변화

도파민(DA)이나 세로토닌(5-HT), 노르아드레날린(NA) 등 카테콜아민계 신경전달물질의 파괴효소로 알려진 모노아민옥시다아제-B(monoamine oxidase-B : MAO-B) 효소의 활성화에 미치는 누에분말(SWP)의 투여효과를 비교하여 보면 Table 4와 같다.

Table 4. Effect of SWP on monoamine oxidase-B (MAO-B) activity in brain of SD rats for 6 weeks

Control	SWP-200	SWP-400
4.30±0.21 ^a	3.92±0.28(91.2%) ^b	3.86±0.31*(89.8%)

SWP-200 and SWP-400 : Silkworm powder of 200 and 400 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean=SD(nmol/mg protein/min) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05 compared with control group.

SWP-200 및 SWP-400투여그룹의 MAO-B효소의 활성은 각각 3.92±0.28 및 3.86±0.31 nmol/mg protein/min으로 대조그룹(4.30±0.21 nmol/mg protein/min : 100%) 대비 각각 91.2% 및 89.8%로서 누에분말 SWP-200 및 SWP-400투여에 의하여 각각 8.8% 및 10.2%의 MAO-B효소 활성의 억제효과가 나타났지만, SWP-400투여그룹에서만 유의성이 인정되었다. 따라서 MAO-B는 카테콜아민계 신경전달물질을 파괴하기 때문에 MAO-B효소의 활성 억제효과는 매우 중요한 의미를 갖는다는 사실을 감안한다면 누에분말 투여도 뽕잎 추출물의 투여와 마찬가지로 장기간 투여한다면 상당한 의미가 있을 것으로 기대된다.

요 약

누에분말(SWP)을 SD계 랫트에 하루 200 및 400 mg/kg BW로써 6주간 투여하여 뇌조직의 아세틸콜린(acetylcholine : ACh) 및 관련효소의 활성에 미치는 영향을 분석·평가하였다. 해독작용과 깊은 관계가 있는 간장조직의 경우, SWP-200 및 SWP-400투여그룹은 대조그룹 대비 각각 4.6% 및 11.5%의 리포푸신(LF)의 축적 억제효과로서, SWP-400투여그룹에서만 유의적인 LF의 축적 억제효과가 인정되었다. 그러나 매우 민감한 뇌조직에서는 SWP-200 및 SWP-400 투여그룹은 대조그룹 대비 각각 16.7% 및 20.0%의 매우 효과적인 LF의 축적 억제효과가 인정되었다.

뇌의 가장 중요한 신경전달물질로서 ACh의 생성에 미치는 SWP-200 및 SWP-400투여그룹의 영향은 기대할 수 없었다. 또한 ACh의 합성에 관계하는 콜린아세틸트랜스퍼라아제(ChAT) 효소의 활성뿐만 아니라 시냅스(synapse)사이의 신경전달의 발현에 관계하는 ACh의 분해효소인 아세틸콜린에스테라아제(AChE)의 활성도 SWP-200 및 SWP-400투여그룹에서 아무런 유의성도 관찰할 수 없었다.

그러나 카테콜아민계 신경전달물질의 파괴에 관계하는 MAO-B효소의 활성은 SWP-200 및 SWP-400투여그룹에서 8.8% 및 10.2%의 억제효과가 나타났지만, SWP-400투여그룹에서만 유의적인 MAO-B활성의 억제효과가 인정되어 카테콜아민계 신경전달물질을 잘 보존할 것으로 기대된다. 이상의 결과는 ACh의 생성 및 관련효소로서 ChAT 및 AChE효소의 활성에는 유의적인 효과는 없었지만, 신경세포를 파괴하는 LF의 축적을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 카테콜아민계 신경전달물질을 파괴하는 MAO-B의 활성을 효과적으로 억제하기 때문에 누에분말의 투여는 뇌기능을 매우 효과적으로 보호할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Cho, M. R. and R. W. Choue, S. H. Chung and J. W. Ryu. 1998. Effects of silkworm powder on blood glucose and lipid levels in NIDDM(type-II) patients. *Korean J. Nutr.* **31(7)**, 1139-1150.
2. Cho, M. R. and R. W. Choue. 1998. A study of folk remedies in type-II diabetic patients. *Korean J. Nutr.* **31(7)**, 1151-1157.
3. Choi, J. H. and B. P. Yu. 1995. Brain synaptosomal aging : Free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. & Med.* **18(2)**, 133-139.
4. Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, K. S. Ryu and W. C. Lee. 1999. Effects of mulberry leaf extract on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 135-140.
5. Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, H. S. Lee and K. S. Ryu. 1999. Effects of silkworm powder on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 141-146.
6. Choi, J. H., D. I. Kim, D. W., Park, S. H., D. W. Kim, J. S. Lee and Y. W. Lee. 1999. Effects of silk fibroin powder on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 216-221
7. Choi, J. H. and President of RDA. 1999. Functional anti-diabetic drink. *Korean Patent Application No. 99-61216*(Dec. 23, 1999).
8. Choi, J. H. and President of RDA. 2000. Functional anti-diabetic drink. *Japanese Patent Application No.*

- 2000-98434(Mar. 31, 2000).
9. Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, H. S. Lee and K. S. Ryu. 2000. Effects of silkworm (*Bombyx mori* L.) powder on lipofuscin, acetylcholine and Its related enzyme activities in brain of SD Rats. *Korean J. Seric. Sci.* **42(1)**, (submitted).
 10. Chung, S. H., J. H. Yu, E. J. Kim and K. S. Ryu. 1996. Blood glucose lowering effect of silkworm. *Bull. K.H. Pharma. Sci.* **24**, 95-100.
 11. Chung, S. H., M. S. Kim and K. S. Ryu. 1997. Effect of silkworm extract on intestinal α -glycosidase activity in mice administered with a high carbohydrate-containing diet. *Korean J. Seric. Sci.* **39(1)**, 86-92.
 12. Ellman, G. L., K. O. Courtney, V. Andres and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
 13. Fletcher, B. L., C. J. Dillard and S. A. L. Tappel. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* **52**, 1-9.
 14. Galgani, F., G. Bocqu  n   and Y. Cadiou. 1992. Evidence of variation of cholinesterase activity in fishes along a pollution gradient in the north sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **19**, 1-6.
 15. Hallak, M. and E. A. Giacobini. 1987. Comparison of the effects of two inhibitors on brain cholinesterase. *Neuropharmacol.* **26(6)**, 521-530(1987).
 16. Kalaria, R. N., M. J. Mitchell and S. Harik. 1987. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 3521-3525.
 17. Lee, H. S., K. S. Chung, S. Y. Kim, K. S. Ryu and W. C. Lee. 1998. Effect of several sericultural products on blood glucose lowering for alloxan-induced hyperglycemic mice. *Korean J. Seric. Sci.* **40(1)**, 38-42.
 18. Lowry, O. H., N. J. Roseborough, L. A. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 19. Namba, T. 1980. Colored Illustrations of WAKAN-YAKU, Vol. II. pp. 82-83.
 20. Odaka, H., n. Miki, H. Ikeda and T. Matsuo. 1992. Effect of disaccharidase inhibitor, AO-128, on postprandial hyperglycemia in rats. *J. Japan Soc. Nutr. Food Sci.* **45(1)**, 27-31.
 21. Park, I. K., J. O. Lee, H. S. Lee, K. Y. Seol and Y. J. Ahn. 1988. Cytotoxic activity of *Bombyx mori* and *Morus alba* derived materials against human tumor cell lines. *Agric. Chem. Biotech.* **41(2)**, 187-190.
 22. Ryu, K. S., H. S. Lee, S. H. Chung and P. D. Kang. 1997. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative conditions of silkworm powder. *Korean J. Seric. Sci.* **39(1)**, 79-85.
 23. Shiomi, S., D. Habu, T. Takeda, S. Nishiguchi, T. Kuroki, T. Tanaka, K. Tsuchida and S. Yamagami. 1998. Significance of peptidoglycan in patients with chronic liver diseases. *J. New Remedies & Clinics* **47(1)**, 32-37.
 24. Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGrawhill, New York.