

db/db 당뇨모델 생쥐에서 손바닥 선인장의 항당뇨 효과

신지은 · 한명주 · 이영철¹ · 문영인² · 김동현³

경희대학교 식품영양학과, ¹한국식품개발연구원, ²북제주군 농업기술센터, ³경희대학교 약학대학

Antidiabetic Activity of *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan* on db/db Mice

Jieun Shin, Myung Joo Han, Young Churl Lee¹, Young In Moon², Dong-Hyun Kim³

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701

¹Korea Food Research Institute, Seoungnam 463-420

²Bukjeju County Rural Community Guidance Center, Bukjeku 695-905
College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701

Abstract – *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan* was administered with diet for 5 weeks on db/db diabetic mice and its antidiabetic activity was investigated. Leaves of *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan* inhibited the increase of body weight, glucose elevation in blood and urine, and protein excretion in urine. *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan* also inhibited the intestinal maltase and sucrase activity on db/bd mice loaded with maltose and sucrose. However, it did not significantly lower HbA1c in blood of db/db mice. These results suggest that leaves of *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan* could be effective on insulin-independent diabetic mellitus type 2.

Key words – *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan*, hypoglycemic activity, db/db mice, antidiabetic activity.

서 론

1999년 사망원인 통계연보에 따르면 지난 90년 당뇨병으로 인한 사망이 사인 순위중 8위였으며, 99년에는 당뇨병 사망률이 크게 증가하여 3위의 사인으로 밝혀졌다.¹⁾ 또한 통계청이 밝힌 2000년 사망원인 통계에 따르면 내분비, 영양 및 대사질환 사망자수 중 1위가 당뇨병이며 이는 내분비, 영양 및 대사질환 사망자수의 68.1%를 차지하였다.²⁾ 이와 같이 당뇨병 및 당뇨병의 동반 질환에 의한 사망률은 계속 증가하고 있다.

한편, 선인장은 노화방지와 항암효과 및 항돌연변이 효과가 있는 페놀성물질과 플라보노이드가 5% 정도 함유되어 있고, 소량의 비타민C가 함유되어 있다. 또한 변비완화와 장운동 활성화에 관여하는 식이 섬유가 30% 이상 함유되어 있다. 잎의 경우 총 식이섬유 함량은 46.1%로 그 중 수용성 식이섬유는 4.3%, 수불용성 식이섬유는 35.9%로 구성되어 있으며, 열매의 경우 총 식이섬유는 36.6%로 그 중 수용성 식이섬유는 17.1%, 수불용성 식이섬유는 16.6%로 구

성되어 있다.^{3,4)} 선인장 잎과 열매는 예전부터 민간요법으로 타박상, 변비, 화상치료에 이용되었으며 이뇨 효과, 장운동 활성화를 돕는다고 알려져 있다. 중약대사전 및 영남체약록, 본진민간초약, 본초강목등의 기록에 의하면 기관지 천식, 폐질환, 위염, 변비, 장염, 고혈압, 당뇨, 신장염, 관절염 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

그러나, 선인장의 항당뇨효과에 대해서는 연구가 되어있지 않으므로 여기에서는 당뇨모델 동물인 db/db 생쥐를 이용하여 손바닥 선인장의 항당뇨 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용한 *Opuntia ficus-indica fructus* (손바닥 선인장 열매), *Opuntia ficus-indica leaves* (손바닥 선인장 잎)의 동결건조 분말은 북제주군 농협에서 제공받아 사용하였다.

Glucose oxidase는 Sigma Chem. Co. (U.S.A.)에서 구입하였다. *o*-phenylene diamine, peroxidase, maltose는 Wako Co. (Japan)에서 구입하였고 sucrose, starch는 Yakuri Co. (Japan)에서 구입하였고 blood glucose test strip은 LXN

*교신저자(E-mail) : dhkim@khu.ac.kr

Corp. (U.S.A.)에서 구입하였고 total glucose kit는 Asan Co. (Korea)에서 구입하였으며 Acarbose는 Bayer Co. (U.S.A.)에서 구입하였다. Bio-protein assay kit는 Bio-Rad Co. (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

실험방법

실험동물

수컷 8주령 *db/db* 마우스를 Charles River사에서 분양 받아 사용하였으며 사료로는 삼양(주) pellet형 곡물 사료를 공급하고, 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 5\%$ 에서 사육하였다.

8 주령의 *db/db* 마우스 중 혈당을 측정하여 당뇨가 유발된 것이 확인된 생쥐를 한군 4 마리씩으로 하여 일반 사료를 공급한 *db/db* 비발현군 (Lean 군), 일반 사료를 공급한 *db/db* 발현군 (Nontreated 군), 손바닥 선인장 열매 분말이 1% 함유된 사료를 공급한 *db/db* 발현군 (Fructus 군), 손바닥 선인장 잎 분말이 1% 함유된 사료를 공급한 *db/db* 발현군 (Leaves 군), 대조 약물인 acarbose가 0.05% 함유된 사료를 공급한 *db/db* 발현군 (Acarbose 군)으로 나누어 5주간 사육하였다.

혈당, 뇨량, 뇨중 포도당량 및 뇨중 단백질량 측정

자유스럽게 물을 섭취할 수 있도록 공급하면서 일주일에 한번 20시간 동안 절식시키며 뇨를 채취하고, 공복시 혈당을 측정하였다. 채취한 뇨를 total glucose 측정용 kit로 뇨중 glucose량을 측정하였고, 뇨중 단백질량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Bradford method⁶⁾로 측정하였다.

몸무게, 사료 섭취량 및 물 섭취량 측정

일주일에 한번 몸무게 변화량을 조사하고, 이틀에 한번 사료 섭취량 및 물 섭취량을 조사하였다.

혈중 당화헤모글로빈(hemoglobin A1c, HbA1c) 측정

5주간의 실험 종료 후 에테르로 가볍게 마취하여 혈액을 심장으로부터 채혈하였다. 당화헤모글로빈 (HbA1c) 측정을 위해 채혈한 혈액중 whole blood 0.2 ml은 EDTA가 처리된 튜브에 넣어 4°C 이하에서 측정시까지 보관하였다. HbA1c는 microparticle enzyme immunoassay(MEIA) 방법으로 7일 이내에 측정하였다.

소장내 분획별 효소액의 처리 및 장점막 효소의 활성 측정

채혈 후 소장 전체를 분리해 saline으로 세척한 후, 이 중

십이지장을 제거한 나머지 부분을 길이에 따라 균등하게 proximal(윗부분), middle(중간부분), distal(아랫부분)의 3부분으로 나누었다. 각 부분의 습중량을 측정한 다음 소장 점막을 끊어내어 생리식염수에 현탁하여 15초간 3회 초음파 처리하고 4°C , $20000 \times g$ 에서 1시간동안 원심 분리 한 후 상층액을 maltase 및 sucrase의 효소로 사용하였다.

Maltase 활성은 효소액 0.1 ml에 기질 0.1 ml (2 mM maltose), 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 0.2 ml을 가하여 37°C 에서 40분간 반응 시킨 후, 100°C water bath에서 2분간 가열하여 반응을 정지 시켰다. $2000 \times g$ 에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 0.1 ml 취한 후 glucose reagent (O-phenylenediamine 0.05 mg/ml, peroxidase 2 unit/ml, glucose oxidase 0.384 unit/ml)를 0.75 ml 가해, 다시 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.5 ml을 가해 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sucrase 활성은 효소액 0.1 ml에 기질 0.1 ml (10 mM sucrose), 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) 0.2 ml을 가하여 37°C 에서 180분간 반응시킨 후, 100°C water bath에서 2분간 가열하여 반응을 정지 시켰다. 3000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 0.1 ml 취한 후 glucose reagent를 0.75 ml 가해, 다시 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.5 ml을 가해 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 실험군간의 유의성 검정은 Student's *t*-test를 수행하여 결정하였다.

결과 및 고찰

비발현군(Lean군)과 약물을 처리하지 않은 발현군(Nontreated군), 발현군에 손바닥 선인장 열매를 투여한 군(Fructus군), 발현군에 손바닥 선인장 잎을 투여한 군(Leaves군), 현재 항당뇨 약물로 사용하고있는 acarbose를 투여한 발현군(Acarbose군)으로 나누어 손바닥 선인장의 항당뇨효과를 조사하였다. 각 군간의 체중 변화를 살펴보면 Lean군에 비해 *db/db* 발현군의 최종 체중은 약 1.5배로 유의적으로 증가되었다. 발현군 간의 체중 변화를 비교하면 Fructus군의 체중증가가 가장 억제되었으며, Leaves군도 Nontreated군에 비해 체중증가가 약간 억제되었다. 하지만 대조약물 투여군인 Acarbose군의 경우 Nontreated군에 비해 체중이 약간 증가하여 체중감소 효과는 없었다(Table I). 이는 Acarbose는 소장에서 탄수화물의 분해 및 흡수를 억제하나 대장으로 유입된 탄수화물이 대장의 미생물에 의해 단쇄지방산으로 대사되어 다시 흡수되므로 에너지의 소실은 없다

Table I. Body Weight Change of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* treated *db/db* Mice

Groups	Body weight (g)				
	Initial	1st week	2nd week	4th week	5th week
Lean	21.0±0.0	21.5±0.7	29.0±1.4	27.3±3.1	29.5±2.1
Nontreated	32.0±0.0	32.5±0.5 [#]	37.0±0.0 [#]	40.5±0.5 [#]	46.5±0.3 [#]
Fructus	32.5±1.0	34.0±1.0	38.5±0.5	39.5±1.5	42.3±2.5*
Leaves	29.0±1.0	30.5±0.8*	36.0±0.5*	39.0±0.7	44.5±1.1*
Acarbose	32.0±1.0	33.0±1.0	39.0±0.0	42.8±0.2	48.5±0.5

Animals were assigned to receive normal chow for lean and nontreated groups, the *Opuntia ficus-indica fructus* powder (1 g/100 g of diet) for fructus group, the *Opuntia ficus-indica leaves* powder (1 g/100 g of diet) for leaves group and acarbose (50 mg/100 g of diet) for acarbose group.

[#]Significantly different from the lean group ($p<0.05$).

*Significantly different from the nontreated group ($p<0.05$).

Table II. Blood Glucose Level of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* treated *db/db* Mice

Groups	Blood glucose level (mg/dl)				
	0 week	1st week	2nd week	4th week	5th week
Lean	47.5±2.1	75.0±21.2	64.0±5.6	71.5±10.6	80.0±2.8
Nontreated	94.5±22.5	161.5±40.5 [#]	205.0±34.0 [#]	258.0±14.0 [#]	199.5±45.5 [#]
Fructus	134.5±56.5	68.5±4.5*	244.5±51.5	358.0±43.0	230.5±23.5
Leaves	138.0±41.0	65.0±30.8*	199.0±37.1	178.0±34.0*	138.0±23.8*
Acarbose	221.0±44.0	123.5±47.5	188.0±26.0	171.0±45.0*	74.5±2.5*

Animals were assigned to receive normal chow for nontreated group, the *Opuntia ficus-indica fructus* powder (1 g/100 g of diet) for fructus group, the *Opuntia ficus-indica leaves* powder (1 g/100 g of diet) for leaves group and acarbose (50 mg/100 g of diet) for acarbose group.

[#]Significantly different from the lean group ($p<0.05$).

*Significantly different from the nontreated group ($p<0.05$).

Table III. Urinary Glucose Content of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* treated *db/db* Mice

Groups	Urinary total glucose (mg/20 h)				
	Initial	1st week	2nd week	4th week	5th week
Lean	1.2±0.4	2.5±1.5	2.1±1.0	1.3±0.7	1.1±0.7
Nontreated	286.0±5.6	318.0±4.6 [#]	572.0±9.6 [#]	572.0±5.3 [#]	586.8±2.0 [#]
Fructus	342.0±0.8	791.6±3.7	521.6±6.3*	521.6±4.4*	506.4±2.4*
Leaves	444.0±4.2	532.0±7.6	452.4±0.4*	452.4±6.4*	488.0±7.1*
Acarbose	532.4±2.6	499.0±3.8	108.4±4.2*	108.4±6.9*	495.2±5.2*

[#]Significantly different from the lean group ($p<0.05$).

*Significantly different from the nontreated group ($p<0.05$).

고 보고한 Ladas 등⁷⁾의 연구나, 사람을 대상으로 한 대부분의 실험에서도 체중감소는 관찰되지 않았다고 보고한 Couet 등⁸⁾의 연구 결과와도 일치하는 것이었으며, acarbose에 의한 체중조절 효과는 기대할 수 없는 반면, 손바닥 선인장 열매는 그러한 효과를 기대할 수 있는 약선소재임을 알 수 있었다. Nontreated군, Acarbose군, Leaves군, Fructus군의 사료 섭취량을 비교 할 경우 군간의 큰 차이는 없었으나, 음수량에서는 Nontreated군에 비해 Acarbose군과 Leaves군은 감소하는 경향을 보였으며, 반대로 Fructus군은 증가하였다 (Data not shown).

db/db 비발현군인 Lean군과 발현군인 Nontreated군, Fructus군, Leaves군, Acarbose 투여군의 혈당 변화를 측정하였다(Table II). Lean군의 경우 혈당이 약간 증가하였으나 1, 2, 4, 5주에 걸쳐 큰 변화가 없음이 관찰되었던 반면, 발현군은 Lean군에 비해 혈당이 아주 큰 폭으로 상승하였다. 발현군간의 혈당을 비교하면, Nontreated군과 Fructus군은 점차적으로 증가 하였으며, Acarbose군은 감소하였고, Leaves군은 2, 4주에는 조금 상승하였으나 큰 변화없이 비교적 고르게 유지되었다.

노중 포도당 변화를 살펴보면 Lean군의 경우 노중 포도

당 농도는 실험기간동안 큰 변화가 없었다(Table III). 반면에 발현군은 Lean군에 비해 뇨중 글루코스 농도가 유의적으로 높았다. 발현군간의 뇨중 글루코스 농도를 비교하면, Nontreated군과 Fructus군은 약물투여전에 비해 크게 증가하였고, Acarbose군은 4주까지 감소하였으나, 5주에는 다시 약간 증가하였다. 그에 비해 Leaves군은 최초의 뇨중 글루코스 농도가 높았으나, 5주째에는 Nontreated군에 비해 유의적으로 뇨중 글루코스 농도가 낮았으며, 실험기간동안 큰 증가나, 감소 없이 고르게 유지 되었다.

뇨중 배설된 단백질 농도의 변화를 살펴보면 Nontreated, Acarbose군의 경우 뇨중 단백질 농도가 크게 증가했다. 반대로 Leaves군과 Fructus군은 유의적으로 감소하였으며, 특히 Leaves군은 아주 큰 폭으로 감소하였다(Data not shown).

이와 같은 결과로 손바닥 선인장 열매와 잎이 *db/db* 마우스에 대해 항당뇨 활성을 나타내는 것을 알 수 있었고, 손바닥 선인장 열매보다는 잎이 체중감소 효과를 가짐과 동시에 혈당, 뇨중 글루코스 농도, 뇨중 단백질 농도의 급격한 변화를 막음으로써 항당뇨 효과를 가지는 약선소재임을 알 수 있었다.

소장을 위부분, 중간부분, 아랫부분으로 구획하여 효소액의 활성을 측정한 결과(Table IV), maltase 효소활성의 경우 Acarbose군을 제외한 모든 군에서 아랫부분이 활성이 가장 높았다. 실험군간의 maltase 효소활성을 비교하면 Acarbose, Leaves군의 활성이 Nontreated, Fructus군에 비해 낮았으며, 소장의 위, 중간, 아래의 모든 부분의 효소 활성을 유의적으로 억제하였다. Sucrase 효소활성의 경우 Leaves군을 제외한 모든 군에서 위부분, 중간부분, 아랫부분 순으로 sucrase 효소활성이 높았고, 이는 위부분의 활성이 가장 높고, 중간부분과 아랫부분으로 가면서 점차 그 활성이 감소한다는

Stanley 등⁹⁾의 보고와 결과가 일치하였다. 반면 Leaves군은 위부분의 효소 활성을 억제하여, 아랫부분, 중간부분, 위부분의 순으로 효소활성이 높았다, 이러한 결과는 김 등¹⁰⁾의 고탄수화물 식이 섭취 마우스에서 상업 및 누에 추출물의 소장 sucrase 효소활성에 대한 효과에 대한 연구 결과와 일치하였으며, 손바닥 선인장 잎은 주로 소장의 위부분의 효소 활성을 저해하여 혈당 강하 효과를 보임을 알 수 있었다.

Allen 등¹¹⁾은 당화헤모글로빈(HbA1c)가 정상인에서는 혈액색소의 약 3-6%를 차지하며, 당뇨병 환자에서는 정상인 보다 2-3배 증가되며, 대부분 HbA1c라고 하였다. 또한 주위의 혈당농도에 비례하여 서서히 증가하므로^{12,13)} HbA1c의 수치는 혈당의 변화를 반영할 수 있다. 따라서 혈중 HbA1c 농도를 측정하였다(Table V). 혈중 HbA1c의 농도는 발현군인 Nontreated군에 비해 Acarbose군이 가장 낮았으나, Nontreated군에 대해 Acarbose군, Fructus군과 Leaves군들이 유의적으로 낮아지는 않았다.

db/db 마우스에 손바닥 선인장 잎과 열매를 5주간 투여하면서 체중, 사료 섭취량, 물섭취량, 혈당변화, 뇨중 포도당 농도변화, 뇨중 단백질량 변화 등을 측정한 결과 손바닥 선

Table V. Blood HbA1c Concentrations in *db/db* mice treated with *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*

Group	Dose (mg/100g/diet)	HbA1c (%)
Lean		5.6±0.25
Nontreated		8.0±1.27
Fructus	1000	8.0±0.78
Leaves	1000	7.4±0.95
Acarbose	50	6.8±0.99

*Significantly different from nontreated group (p<0.05).

Table IV. Contents of instestinal protein and α-glucosidase activities in *db/db* mice

Group		Wet weight (g)	Protein (mg)	Maltase (unit/mg/weight)	Sucrase (unit/mg/weight)
Nontreated	proximal	0.44±0.05	7.87±0.50	294.65±1.02	25.4±0.56
	middle	0.31±0.01	2.44±2.01	342.39±0.56	11.96±0.62
	distal	0.27±0.01	1.32±0.21	548.13±1.68	8.34±0.87
Fructus	proximal	0.41±0.03	5.64±6.41	202.34±1.31*	22.26±0.37
	middle	0.31±0.04	3.92±0.50	303.72±0.76*	17.70±0.81*
	distal	0.26±0.06	6.37±4.42	739.25±0.58	12.17±0.49
Leaves	proximal	0.51±0.05	4.95±2.15	102.64±1.66*	8.08±0.56*
	middle	0.38±0.05	2.16±2.15	244.64±0.95*	11.08±0.28
	distal	0.23±0.05	2.79±2.15	341.23±0.39*	13.55±0.75
Acarbose	proximal	0.47±0.13	6.83±2.19	95.59±1.36*	18.15±0.45*
	middle	0.36±0.09	5.25±2.52	144.61±0.98*	12.93±0.22
	distal	0.29±0.04	3.25±1.12	115.15±1.12*	10.74±0.54

*Significantly different from nontreated group (p<0.05).

인장 잎을 투여한 군에서 항당뇨 활성이 확인되었다. 체중 증가 억제와 뇨중 단백질 감소에는 손바닥 선인장 열매도 효과가 있었으나, 유의적으로 억제하지는 못하였다. 따라서 손바닥 선인장 손바닥 선인장 잎은 당뇨병을 개선하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

db/db 발현군 당뇨병 모델 생쥐를 사용하여 5주간 손바닥 선인장 잎 또는 열매를 투여하면서 당뇨병 개선효과를 조사하였다. 체중 변화를 살펴보면 *db/db* 비발현 *Lean*군에 비해 *db/db* 발현군의 체중은 최종은 5주 후에 약 1.5배 정도였다. 그러나, 손바닥 선인장을 투여한 경우 체중 증가가 억제되었다. *db/db* 발현군은 *Lean*군에 비해 혈당과 뇨중 글루코스의 농도가 아주 큰 폭으로 상승하였으나 손바닥 선인장 잎은 유의적으로 혈당상승을 억제하였으며 뇨중 포도당 농도도 억제하였다. 또한 손바닥 선인장은 *db/db* 발현군의 뇨중 단백질 배설도 억제하였다. 소장의 *maltase*와 *sucrase*의 활성을 억제하였으며 손바닥 선인장 열매는 소장의 윗부분, 중간부분의 *maltase* 효소활성을 억제하였으며, 손바닥 선인장 잎은 소장의 모든 부위의 *maltase* 효소활성을 감소시켰다. 또한 손바닥 선인장 잎은 소장의 윗부분의 활성을 저해하여 혈당강하 효과를 보임을 알 수 있다. 당화헤모글로빈(HbA1c)의 농도는 발현군인 *Nontreated*군, *Fructus*군, *Leaves*군 및 *Acarbose*군간에 유의한 차이가 없었으나, 손바닥 선인장 잎을 투여한 군의 경우에는 HbA1c의 혈중 농도가 감소하는 경향을 나타냈다.

인용문헌

1. <http://www.richis.org/dbbank/pratic/stat2/99dttabl.htm> (2002).
2. http://www.nso.go.kr/cgi-bin/sws_999.cgi (2002).
3. Lee, Y. C., Hwang, K. H., Han, D. H. and Kim, S. D. (1997) Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**(5): 847-853.
4. <http://www.bukjeju.agri.cheju.kr/total/good/001.htm> (2002).
5. <http://members.tripod.co.kr/orange72/sub-2> (2002).
6. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
7. Ladas, S. D., Frydas, A., Papadopoulos, A. and Raptis, S. A. (1992) Effect of -glucosidase inhibitors on mouth to caecum transit time in humans. *Gut.* **33**: 1246-1248.
8. Couet, C., Ulmer, M., Bau, H. M. and Debry, G. (1989) Metabolic effects of acarbose in young healthy men. *European. J. Clinical Nutrition.*, **43**: 187-196.
9. Stanley, M. L. and Sergio, B. Chronic effects of an -glucosidase inhibitor (Bay O 1248) on intestinal disaccharidase activity in normal and diabetic mice. *J. Pharm. & Experimental Therapeutics.* **240**: 132-137 (1986).
10. Choue, R. W., Chung, S. H. and Kim, M. S. Effect of Mori Folium column Fraction on Intestinal alpha-glycosidase Activity in Mice Administered with a high carbohydrate-containing diet. *J. Pharmaceutical Society of Korea.* **41**(4): 484-491 (1997).
11. Allen, D. W., Schrodeder, W. A. and Balog, J. (1958) Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult & fetal human hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**: 1628.
12. Miller, J. A., Gravallesse, E. and Bunn, H. F. (1980) Nonenzymetic glycosylation of erythrocyte membrane protein. *Clin. Invest.* **65**: 896.
13. Yue, D. K., Morris, K., Molennun, S. and Turtle, J. R. (1980) Glycosylation of plasma protein and it's relation to glycosylated Hb in diabetes. *Diabetes.* **29**: 296- .

(2002년 8월 8일 접수)