

오디, 뽕잎 및 누에의 혼합비율에 따른 Streptozotocin 유발 당뇨쥐에서의 항산화 효과 및 지질대사개선 효과

권은혜 · 정명애 · 이순재 · 최상원 · 조성희[§]

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Antioxidant Effects and Improvement of Lipid Metabolism of Mulberry fruit, Mulberry Leaves and Silkworm Powder with Different Mixing Ratios in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Kwon, Eun-Hye · Jung, Myung-Ae · Rhee, Soon-Jae · Choi, Sang-Won · Cho, Sung-Hee[§]

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of mulberry fruit, mulberry leaves and silkworm powder with different mixing ratios on hepatic antioxidative system and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats weighing 100 ± 10 g were induced diabetic by 50 mg/kg bw streptozotocin and randomly assigned to following experimental groups: normal diet group (DM), 0.3% and 0.6% mulberry fruit diet groups (F and 2F), 0.3% mulberry leaves diet group (M), 0.3% silkworm powder diet group (S), 0.15% mulberry fruit + 0.15% mulberry leaves diet group (FM), 0.15% mulberry fruit + 0.15% silkworm powder diet group (FS), 0.1% mulberry fruit + 0.1% mulberry leaves + 0.1% silkworm powder diet group (FMS). The experimental diets were fed for 4 weeks. Hepatic SOD activity was not changed significantly by any of single or combined supplementations of mulberry fruit, leaves and silkworm powder but GSH-px and catalase activities were increased by the groups supplemented with two or three of the test ingredients (FM, FS, FMS) as compared with the DM group. Hepatic TBARS value was not reduced significantly by any of the supplementations but lipofuscin contents were significantly reduced in the FM, FS and FMS groups as compared with the DM group. Hepatic mitochondria and microsomal carbonyl values were reduced by the single and combined supplementations of the test ingredients. Hepatic HMG-CoA reductase activities were increased in the all supplementation groups as compared with the DM group. Hepatic total lipid and triglyceride contents were increased but cholesterol contents reduced in the supplemented groups. The effects on the enzyme activities, peroxide or its products and lipid contents were most remarkable in the FMS group. In conclusion, mulberry fruit, mulberry leaves and silkworm powder have the favorable effects on antioxidative system and lipid metabolism in the diabetic liver and the mulberry fruit, leaves and silkworm powder with equal ratio exert the synergistic effect expectedly to prevent diabetic complications. (*Korean J Nutrition* 39(2): 91~99, 2006)

KEY WORDS : diabetic, mulberry, silkworm, antioxidative system, lipid metabolism.

서론

제 I 형 당뇨병은 체장에서 분비되는 혈당 조절 호르몬인 인슐린의 양이나 기능이 부족하여 고혈당과 당뇨 증세가 나타나는 대사이상 질환으로 신장 및 심장 등의 여러 기관에

영향을 주어 심각한 당뇨합병증인 당뇨병 망막증, 신장병, 동맥경화, 고혈압, 말초 신경 장애, 고지혈증, 심혈관계 질환 등을 야기시킨다. Wada 등¹⁾은 당뇨쥐에서 과산화적 손상에 의해 지질과산화물의 축적이 증가되고 혈청 중성지질 수준이 증가된다고 보고하였고 산화적 스트레스가 당뇨합병증에 관여한다는 보고도 있다.²⁾ 당뇨합병증의 예방방안으로 산화적 스트레스의 억제, 제거 및 지질대사 개선을 주장하는 연구보고들이 증가하고 있으며^{3,4)} 천연물로부터 당뇨병의 예방과 억제를 위한 물질을 찾으려는 연구들이 진행되고 있다.⁵⁾ 민간에서 당뇨병 치료의 목적으로 사용되고

접수일 : 2005년 10월 28일

채택일 : 2006년 2월 10일

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : shcho@cu.ac.kr

있거나 또는 항당뇨 작용이 기대되는 천연 유래 물질 중에서 오디, 뽕잎 및 누에 등의 잠상물질로부터 그 개발을 기대할 수 있어 많은 연구들이 진행되고 있다.⁶⁻⁹⁾

오디는 주로 anthocyanin 계통의 색소를 가지고 있으며, cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside가 주요 성분이며 그 비율이 7 : 3 정도로 분포한다. Anthocyanin 색소는 노화 억제, 당뇨병성 망막장애의 치료, 시력개선효과 및 항산화 작용 등¹⁰⁾ 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되었다. 이외에 오디 속에 존재하는 영양성분은 일반과실에 비해 전반적으로 높고, 특히 Ca, K 및 vitamin C의 함량은 후지 사과에 비해 각각 14배, 2배 및 18배 높다고 하였으며, vitamin C는 감귤보다도 1.5배 높고,¹¹⁾ 항산화성분인 chlorogenic acid가 함유되어 있다고 보고되었다.¹²⁾ 한 방에서 오디는 상심(桑), 상실(桑實), 오심(烏) 등으로 불리며, 당뇨병으로 불리우는 소갈(消渴)의 치료에 사용되어 왔다. 생리활성기능에 대한 최근 연구보고로는 오디의 항당뇨 효능,¹³⁾ 꾸지뽕나무의 과산화지질 억제효과,¹⁴⁾ 뽕나무 오디 추출물의 항염증 및 항산화 작용에 대한 생리활성 검사,¹⁵⁾ 쥐 적출 대동맥의 수축 및 이완작용에 미치는 오디 품종간 안토시아닌 색소의 효과¹⁶⁾ 등의 많은 연구가 보고되고 있다. 뽕잎은 콜레스테롤 저하, 당뇨, 고혈압, 동맥경화 및 중풍예방 등 성인병에 효과가 크며, 중금속 제거, 노화 억제, 변비 완화 및 이뇨 효과, 순환계 정화 및 암 예방 등의 건강을 유지하는데 다양한 효과를 가진 것으로 보고되었다.^{17,18)} 누에는 강력한 혈당 강하 작용뿐만 아니라^{7,8)} 혈청 중 활성산소 감소 및 제거효소의 활성화, 중성지방의 감소 및 동맥경화지수의 감소 효과가 밝혀졌다.¹⁹⁾ 그러나 우수한 항산화 효능과 지질대사 개선효능을 가진 오디, 뽕잎 및 누에 사이의 혼합에 의한 항산화효과에 관한 연구는 아직 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 잠상산물 가운데 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합에 따른 당뇨 쥐에서의 항산화 효과와 지질대사 개선효과를 알아보기 위해 아직 이용도가 높지 않은 오디를 주로 하여 뽕잎 및 누에의 혼합으로 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 오디는 2005년 5월말부터 6월 중순까지 뽕나무 주산지인 경북 영천에서 재배하고 있는 청일뽕나무로부터 수확한 오디를 실험재료로 사용하여 급속 동결 건조한 후 파쇄하여 사용하였다. 누에가루는 영천양잠농업협

동조합에서 사육한 누에 중 5주령 3일된 것을 급속 동결 건조한 후 파쇄하여 사용하였다. 뽕잎은 YK-209 뽕잎으로 같은 해 5월 경북 영천에서 채취하여 수세한 후 60℃에서 열풍 건조한 후 파쇄하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 식이

실험동물은 체중 100 ± 10 g내외의 Sprague-Dawley 종 수컷을 바이오제노믹스사 (Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 본 사육전 환경에 적응시키기 위해 일반 고형 사료 (퓨리나 실험용 쥐사료 5053)로 일주일간 예비사육한 후, 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 10마리씩 8군으로 나누었다. 실험군은 당뇨대조군 (DM) 0.3% 오디 투여군 (F), 0.6% 오디 투여군 (2F), 0.3% 뽕잎 투여군 (M), 0.3% 누에 투여군 (S), 0.15% 오디 + 0.15% 뽕잎 혼합 투여군 (FM), 0.15% 오디 + 0.15% 누에 혼합 투여군 (FS) 및 0.1% 오디 + 0.1% 뽕잎 + 0.1% 누에 혼합 투여군 (FMS) 등 8군으로 나누었으며 식이는 주 7일로 3주간 공급하였다. 식이는 4℃에서 보관하였으며 매일 일정 시간에 공급하여 자유로이 섭취하게 하였다. 기본 실험 식이는 Table 1과 같다. 식수는 자유 섭취하도록 하였다. 식이 섭취량은 매일 측정하였고 체중은 3일에 한번씩 측정하였다. 사육실의 환경은 실내온도 20~22℃, 명암 주기 12시간 (light 6 : 00~18 : 00)으로 유지하였다.

3. 당뇨유도

인슐린 의존성 당뇨병과 유사한 실험 모델을 만들기 위해서 streptozotocin (STZ) 50 mg/kg body weight를 꼬리 정맥을 통하여 주사하여 당뇨를 유발시켰으며 당뇨유발 확인 후 9일째 되는 날 혈당량이 300 mg/dL 이상인 동물만 실험에 사용하였다.

4. 시료 수집 및 전처리

실험종료 후 가벼운 에테르 마취 하에서 개복하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취한 후 즉시 간조직을 적출하여 차가운 생리 식염수에 세척한 후 여과지로 여분의 물기를 제거하고 간조직의 무게를 측정한다 다음 실험 사용 직전까지 액체질소로 급속 냉동시킨 후 -70℃에 냉동 보관하였다.

5. 분석방법

1) 간조직의 효소 활성 측정용 시료의 전처리

각 간엽에서 일정량의 간장을 취하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25 M sucrose/0.5 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)/5 mM N-2-hydroxyethyl -piperazine-N-2-ethane sulfonic acid

Table 1. Compositions of diets for experiment groups

Ingredients	Groups (g/kg diet)								
	DM ¹⁾	F ²⁾	2F ³⁾	M ⁴⁾	S ⁵⁾	FM ⁶⁾	FS ⁷⁾	FMS ⁸⁾	
Corn starch ⁹⁾	698	695	692	695	695	695	695	695	
Casein ¹⁰⁾	150	150	150	150	150	150	150	150	
DL-methionine ¹¹⁾	2	2	2	2	2	2	2	2	
Salt mix ¹²⁾	40	40	40	40	40	40	40	40	
Vitamin mix ¹³⁾	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn oil ¹⁴⁾	50	50	50	50	50	50	50	50	
Cellulose ¹⁵⁾	50	50	50	50	50	50	50	50	
Mulberry fruits ¹⁶⁾	-	3	6	-	-	1.5	1.5	1	
Mulberry leaves ¹⁷⁾	-	-	-	3	-	1.5	-	1	
Silkworm powder ¹⁸⁾	-	-	-	-	3	-	1.5	1	
Total (g)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

¹⁾DM: Injection of streptozotocin + no supplementation mulberry fruit of mulberry leaves or silkworm powder

²⁾F: Injection of streptozotocin + 3 g (0.3%) mulberry fruits

³⁾2F: Injection of streptozotocin + 6 g (0.6%) mulberry fruits

⁴⁾M: Injection of streptozotocin + 3 g (0.3%) mulberry leaves

⁵⁾S: Injection of streptozotocin + 3 g (0.3%) silkworm powder

⁶⁾FM: Injection of streptozotocin + 1.5 g (0.15%) mulberry fruits + 1.5 g (0.15%) mulberry leaves

⁷⁾FS: Injection of streptozotocin + 1.5 g (0.15%) mulberry fruits + 1.5 g (0.15%) silkworm powder

⁸⁾FMS: Injection of streptozotocin + 1 g (0.1%) mulberry fruits + 1 g (0.1%) mulberry leaves + 1 g (0.1%) silkworm powder

⁹⁾Sam Yang Co., Seoul, Korea

¹⁰⁾Lactic casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wellington, N. Z.

¹¹⁾Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri, U.S.A

¹²⁾Mineral mix, AIN-76 (g/kg mixture): Calcium Phosphate, dibasic (CaHPO₄ · 2H₂O) 500, Sodium chloride (NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate (K₃C₆H₅O₇ · H₂O) 220, Potassium sulfate (K₂SO₄) 52, Magnesium oxide (MgO) 24, Manganous carbonate (45 - 48% Mn) 3.5, Ferric citrate (16 - 17% Fe) 6, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate (53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate (KIO₃) 0.01, Sodium selenite (Na₂SeO₃ · 5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate [CrK(SO₄)₂ · 12H₂O] 0.55, filled up to 1,000 with sucrose, Harlan TEKLAD Co.

¹³⁾Vitamin mix, AIN-76A (g/kg mixture): δ -aminobenzoic Acid 11.0132, ascorbic acid, coated (97.5%) 101.6604, Biotin 0.0441, Vitamin B₁₂ (0.1% trituration in mannitol) 2.9736, Calcium Pantothenate 6.6079, Choline Dihydrogen Citrate 349.6916, Folic Acid 0.1982, Inositol 11.0132, Menadione 4.9559, Niacin 9.9119, Pyridoxine HCl 2.2026, Riboflavin 2.2026, Thiamin HCl 2.2026, Dry Vitamin A Palmitate (500,000 U/g) 3.9648, Dry Vitamin D₃ (500,000 U/g) 0.4405, Dry Vitamin E Acetate (500 U/g) 24.2291, Corn Starch, Harlan TEKLAD Co.

¹⁴⁾Dong Bang oil Co., Seoul, Korea

¹⁵⁾Sigma Chem. Co. CMC (Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber), St. Louis, Missouri, U.S.A

¹⁶⁾Mulberry fruits

¹⁷⁾Mulberry leaves

¹⁸⁾Silkworm powder

(HEPES) 용액으로써 10% (w/v) 마쇄액을 만들었다. 마쇄액은 6,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 산화지질 정량에 사용하였고, 나머지는 7,200 rpm에서 30분간 원심분리하여 그 상층액 일정량을 취하여 0.4배량의 ethanol : chloroform 냉 혼합액 (5 : 3)을 가하고 2분간 진탕한 다음 7,200 rpm으로 원심분리한 후 상층액의 일부는 다시 30,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 glutathione peroxidase 및 superoxide dismutase 등의 함량 및 활성도를 측정하였다. 모든 실험조건은 4℃를 유지하면서 행하였다.

각 간엽에서 일정량의 간장을 취하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 280 mM sucrose/10 mM KCl/10 mM HEPES 용액으로써 10% (w/v) 마쇄액을 만들었다. 마쇄액은 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 하층은 sucrose buffer를 1 mL 가하여 mitochondria를 얻었으며,

상층액을 다시 9,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 36,500 rpm에서 60분간 원심분리하여 하층에 sucrose buffer를 1 mL 가하여 microsome을 얻었다.

Catalase (CAT) 활성 측정을 위해서는 상기 효소분석용 시료와 같은 방법으로 마쇄하여 2,300 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 미토콘드리아 분획을 다시 2,300 rpm에서 20분간 원심분리시켜 침전물을 취하고 0.25 M sucrose 용액에 현탁시킨 다음 2,300 rpm에서 20분간 재원심분리하여 얻은 침전물에 소량의 0.25 M sucrose 용액에 재현탁시켜 CAT 활성 측정에 사용하였다.

2) 항산화 효소 활성도 측정

(1) 간조직의 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정
간조직의 SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방

법²⁰⁾에 따라 측정하였다. 즉 tris-HCl buffer (50 mM Tris/10 mM EDTA, pH 8.5) 1.5 mL에 효소용액 0.1 mL를 넣고 7.2 mM pyrogallol 0.1 mL를 가함으로서 반응을 시작시킨 다음 25°C에서 정확히 10분 간 반응시킨 후 1N-HCl 0.05 mL를 가하여 반응을 정지시켜 산화된 pyrogallol의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다.

(2) 간조직의 glutathione peroxidase (GSH-px) 활성 측정

간조직의 GSH-px 활성은 Lawrence 및 Burk의 방법²¹⁾에 따라 측정하였다. 즉 1 mM의 EDTA를 함유하는 pH 7.0의 0.1 M potassium phosphate buffer 1.72 mL 효소용액 0.05 mL와 0.2 mM NADPH 0.3 mL, glutathione 그리고 효소활성의 1단위를 1분간 1 μ nmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

(3) 간조직의 catalase (CAT) 활성 측정

간조직의 CAT 활성은 Aebi 등의 방법²²⁾으로 측정하였다. 즉 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 2.89 mL에 기질인 30 mM H₂O₂를 100 μ L를 넣어 25°C, 240 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다. H₂O₂의 흡광도 변화와 H₂O₂의 몰흡광계수로 H₂O₂의 농도를 구하여 효소활성도를 계산하였다.

3) 산화적 손상 측정

(1) 간조직의 과산화지질 (TBARS) 정량

간조직의 과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 물질인 TBA reactive substances (TBARS)를 측정하는 Satoh의 방법²³⁾을 이용하였다. 간조직을 마쇄하여 6,500 rpm에서 처리하여 얻은 상층액 0.5 mL에 10% TCA 용액 2.5 mL를 가하여 잘 섞은 다음, 실온에서 10분 간 방치한 후 3,500 rpm에서 10분 간 원심분리 하여 상층액을 버리고 침전물을 0.05 M H₂SO₄으로 1회 세척하여 생성된 침전물에 0.05 M H₂SO₄ 2.5 mL와 0.6% TBA 3.0 mL를 가하여 잘 섞은 후, 95°C 항온 수조에서 30분간 가열한 다음 즉시 냉각시켰다. 여기에 n-butanol : pyridine 혼합액 (15 : 1, v/v) 3.0 mL를 가하여 잘 섞은 후, 3000 rpm에서 10분 간 원심분리 하여 그 상층액을 취하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준품으로 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane을 사용하였다.

(2) 간조직의 lipofuscin 측정

생체 내 malondialdehyde (MDA)와 단백질 성분이 결합하여 생성되는 것으로 알려진 소모성 노화색소인 lipofu-

scin의 측정은 Fletcher의 방법²⁴⁾에 따라 측정하였다. 간조직을 일정량 취하여 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer/5 mM EDTA solution (pH 7.4) 용액으로써 마쇄하였다. 마쇄액의 일부는 chloroform : methanol 혼합액 (2 : 1, v/v)과 증류수를 각각 4 mL씩 넣고 3,000 rpm에서 원심분리 하여 그 하층액을 spectrofluorometer (JASCO, FP-770)로 excitation 파장 345 nm와 emission 파장 435 nm에서 측정하였고 표준품으로는 quinine sulfate를 사용하였으며 아래의 식으로 결과를 정리하였다.

Lipofuscin (μ g/mg protein) =

Sample 형광도/Standard 형광도 \times 표준용액 농도 (μ g/mg)

(3) 간 microsome 및 mitochondria의 carbonyl value 측정

간 조직의 microsome 및 mitochondria 중의 산화된 단백질의 함량은 Levin 등의 방법²⁵⁾에 따라 carbonyl 화합물의 생성량을 측정하였다. 0.1 mL의 시료에 trichloroacetic acid (TCA) 0.5 mL 혼합, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 뒤 잔사에 10 mM dinitrophenylhydrazine (DNPH) 0.5 mL 첨가하여, 15분마다 혼합하며 1시간 동안 실온에 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (v : v = 1 : 1) 3 mL를 첨가하여 실온에서 10분 방치한다. 다시 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 잔사를 얻은 뒤 6 M guanidine (20 mM potassium phosphate buffer, pH 2.3) 1.0 mL를 첨가하여 혼합한 후 37°C의 항온수조에서 15분간 가온한 후 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl value의 양은 360 nm 흡광도의 파장에서 분자흡광계수 (E = 22,000)를 이용하여 계산하였다.

4) 간에서의 지질대사 측정

(1) 간조직 중의 HMG-CoA reductase의 활성 측정

간조직으로부터 microsome을 분리한 다음 Hulcher 등²⁶⁾의 방법을 수정 보완하여 사용하였다. 즉 150 μ mole HMG-CoA와 2 mM NADPH를 500 μ g microsome protein과 잘 섞은 후 0.1 M triethanolamine, 0.02 M EDTA (pH 7.4) 완충용액으로 1 mL를 채우고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 0.01 M sodium arsenite 20 μ L를 넣고 상온에서 1분 이상 반응시킨 후 100 μ L의 2 M citrate (pH 3.5), 3% Na-tungstate 완충용액을 넣고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응물을 18,300 rpm에서 15분간 4°C에

서 원심분리한 다음 상층액 1 μL을 새로운 시험관에 옮겼다. 여기에 200 μL의 2 M tris (pH 10.6)와 100 μL 2 M tris (pH 8.0)를 섞어 실온에서 3~4분간 반응시킨 후 분광광도계용 측정용 큐벳에 옮겼다. 마지막으로 20 μL의 3 mM 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M triethanolamine, 0.2 M EDTA (pH 7.4) 완충용액을 넣고 잘 섞은 후 412 nm에서 4분간 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도는 nmoles/min/mg (nmoles CoA-SH formed/min/mg microsomal protein)으로 환산하여 나타내었다.

(2) 간조직 중의 총지질, 중성지방 및 콜레스테롤 함량 측정

간조직의 총지질은 Folch 등²⁷⁾의 방법에 의해 추출하여 증량법으로 정량하였고 간조직의 개별 지질의 정량을 위하여 Sale 등²⁸⁾의 수정된 방법을 사용하였다. 간조직의 총지질 중의 중성지방과 콜레스테롤 측정용 효소시약 (Asan Co. Korea)을 가한 후 유화제로서 0.5% triton X-100과 3 mM sodium cholate를 혼합하여 발색시 일어나는 탁도 (turbidity)를 제거하고 각각의 측정과정에서 흡광도를 측정하였다.

6. 단백질 함량 측정

각 시료의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였으며, 각 효소의 단백질 정량은 Lowry법²⁹⁾을 이용하여 정량하였다.

7. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 표준차가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 분산분석 (ANOVA 검증)결과 유의성이 발견된 경우 군 간의 유의도는 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 항산화 효소 활성도

1) 간조직의 Superoxide dismutase (SOD) 활성

세포내 호흡 작용의 부산물로서 생성되는 superoxide radical은 SOD 반응에 의해 제거되므로써 세포를 보호한다.³⁰⁾ 이 SOD 활성을 당뇨쥐의 간조직 내에서 측정된 결과는 Table 2와 같다. 즉, 당뇨대조군에 비해 오디 (F), 뽕잎 (M) 및 누에가루 (S)를 단독 투여한 군들의 SOD활성은 거의 변화하지 않았으나 오디의 농도를 높이거나 (2F) 오디와 뽕잎 (FM). 오디와 누에가루 (FS) 및 오디, 뽕잎, 누에가루 3종이 모두 혼합한 경우 (FMS) 활성이 낮아지

Table 2. Effects of mulberry fruit using products on hepatic SOD, GSH-px and CAT activities in STZ-induced diabetic rats

Groups ¹⁾	SOD	GSH-px	CAT
	(unit/min/mg protein)	(nmol NADPH/min/mg protein)	(nmol/min/mg protein)
DM	6.85 ± 1.59 ^{2)3)4)ns}	142.54 ± 17.62 ^c	4.09 ± 0.48 ^c
F	6.53 ± 0.71	155.34 ± 14.70 ^{bc}	4.96 ± 0.78 ^{bc}
2F	5.78 ± 0.93	175.65 ± 13.78 ^{bc}	5.50 ± 0.66 ^{bc}
M	6.74 ± 1.22	169.80 ± 16.99 ^{bc}	5.42 ± 0.77 ^{bc}
S	6.37 ± 0.48	181.14 ± 9.41 ^b	5.29 ± 0.97 ^{bc}
FM	5.98 ± 1.16	174.15 ± 11.16 ^{bc}	6.08 ± 0.83 ^{ab}
FS	5.66 ± 1.02	186.42 ± 18.33 ^{ab}	6.07 ± 0.49 ^{ab}
FMS	5.61 ± 0.54	210.84 ± 37.00 ^a	6.92 ± 0.28 ^a

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are mean ± SE (n = 10) Values within a column with different superscripts are significantly different at p > 0.05 by Tukey's test.

³⁾Not significant

는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 같은 조건의 당뇨 유발로 간조직과 적혈구에서 SOD가 감소하였으나 뽕잎³¹⁾이나 오디³²⁾에 의하여 이 저하된 활성을 회복시키지 못하였다는 결과와 일치하였다.

2) 간조직의 Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성

GSH-Px는 모든 포유동물의 조직에서 발견되며 GSH를 사용하여 H₂O₂와 organic hydroperoxides를 제거시키는 반응을 촉매하므로써 세포내에서 반응성이 강한 과산화물을 제거하여 세포를 보호한다. 이때 생성된 산화형 glutathione (GSSG)은 glutathione reductase에 의해 다시 환원형 GSH로 전환된다. STZ로 유발된 당뇨쥐에서 정상에 비하여 간조직의 GSH-Px가 약 7~10% 감소하는 것을 보고한 바 있다.^{4,31)} 본 실험에서 측정된 당뇨대조군의 GSH-Px 활성 (Table 2)은 전보³¹⁾에서 보고한 값과 거의 같은 수준이었다. 식이에 오디, 뽕잎 및 누에가루가 단독으로 또는 복합적으로 함유된 식이를 섭취한 실험군들에서 당뇨대조군에 비하여 대체적으로 높게 나타났으며 누에가루 (S)를 포함 군들 (S, FS, FMS)에서 유의적으로 높게 나타났다 (Table 2). 특히 오디, 뽕잎 및 누에가루가 모두 함유된 FMS군에서는 당뇨대조군에 비해 47%가 증가되어 가장 높아 누에가루 효과가 오디와 뽕잎가루가 공존시 시너지 효과를 보이는 것으로 사료된다.

3) 간조직의 Catalase (CAT) 활성

Catalase는 조직 세포 속에 존재하여 대사산물인 H₂O₂를 순간적으로 산화시켜 H₂O와 O₂로 분해함으로써 생체를 산소독으로부터 보호한다. STZ에 의한 당뇨유발로 간조직의 catalase효소 활성이 증가되었다고 보고된 바³³⁾도 있으나 본

연구자들의 전보³²⁾에서 적혈구 효소활성은 감소되는 것으로 나타났다. 본 결과에서 당뇨 자체에 의한 간조직의 catalase 활성조사가 정상상태와 비교하지 못한 미흡한 점이 있으나 Table 2에서 보여 주는 바와 같이 오디, 뽕잎 및 누에의 투여로 활성이 증가되는 양상은 GSH-Px의 활성 변화와 유사하였다. 적혈구에서는 오디만으로도 효소활성이 정상 수준으로 회복되었으나 본 결과에서는 오디, 뽕잎 및 누에를 2종 혹은 3종으로 복합 투여한 군들에서만 효소 활성이 유의적으로 증가하였다.

식물에서 천연항산화물질이 함유되어 있는 것으로 많이 알려졌으며 우리나라에서도 자생식물이나 김치 같은 고유식품들의 항산화기능이 알려진 바 있다. 납 독성이 유발된 쥐에게서 녹차, 감, 홍화잎 추출물 섭취가 SOD, GSH-Px 활성을 증가시켜 독성을 완화시켰다는 보고³⁴⁾가 있고, 노화쥐에게 김치를 섭취시킨 쥐의 간조직의 SOD, GSH-Px, catalase 등 3종의 효소활성이 모두 증가하였다는 보고도 있다.³⁵⁾ 최근에는 야생식물인 열매지 추출물도 생쥐의 적혈구 SOD와 catalase 활성을 증가시켰다고 보고되었다.³⁶⁾ 이러한 효과를 나타내는 성분들에 공통점은 폴리페놀성이라는 점에서 본 연구에서 사용한 뽕잎 등에 함유된 플라보노이드 화합물³⁷⁾과 유사하다고 할 수 있다. 그러나 폴리페놀성 물질의 다양성으로 인하여 효소활성에 미치는 기전은 다를 수도 있다고 생각된다. 본 연구에서 오디, 뽕잎, 누에가루 등에 의하여 SOD의 활성의 변화가 없었던 이유가 타 연구에서 사용된 식물성분과 차이로 생각되며 차후의 연구가 요망된다.

2. 산화적 손상

1) 간조직의 과산화지질 (TBARS)

산화적 손상의 지표가 되는 지질과산화물인 TBARS가 당뇨에 의하여 증가된다는 결과는 동물실험^{4,31-33)} 뿐 아니라 인체시험^{38,39)}에서도 보고되고 있다. 본 실험 결과 Table 3과 같이 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여 군에서 TBARS 함량이 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 전보⁴⁰⁾에서 뽕잎과 누에가루만을 여러 비율로 변화시켜 조사하였을 때와 같았으나 이번 결과에서는 오디를 부가적으로 첨가한 FMS군에서도 효과가 별로 없음을 보여주고 있다.

2) 간조직의 lipofuscin

생체 노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 체내의 lipofuscin도 당뇨에 의하여 정상상태에서보다 유의적으로 높다는 것이 타 연구자들의 보고⁴¹⁾와 본 연구자들의 전보³¹⁾에

Table 3. Effects of mulberry fruit using products on hepatic TBARS and lipofuscin values in STZ-induced diabetic rats

Groups ¹⁾	TBARS	Lipofuscin
	(MDA nmol/mg protein)	(μ g/mg protein)
DM	11.59 \pm 1.59 ^{2)3)4)ns}	9.28 \pm 1.08 ^a
F	10.71 \pm 0.71	8.06 \pm 1.55 ^{ab}
2F	10.14 \pm 0.93	6.88 \pm 1.20 ^{ab}
M	10.25 \pm 1.22	7.00 \pm 1.46 ^{ab}
S	10.86 \pm 0.48	7.05 \pm 0.90 ^{ab}
FM	9.82 \pm 1.16	6.24 \pm 1.05 ^b
FS	9.93 \pm 1.02	6.62 \pm 0.17 ^b
FMS	10.17 \pm 0.54	5.56 \pm 1.14 ^b

¹⁾See the legend of Table 1.
²⁾Values are mean \pm SE (n = 10) Values within a column with different superscripts are significantly different at p > 0.05 by Tukey's test.
³⁾Not significant

Table 4. Effects of mulberry fruit using products on hepatic carbonyl values in STZ-induced diabetic rats

Groups ¹⁾	Mitochondria	Microsome
	(nmol/mg protein)	
DM	139.99 \pm 4.18 ^{2)a}	128.51 \pm 4.38 ^a
F	101.24 \pm 0.78 ^b	112.08 \pm 7.30 ^b
2F	100.20 \pm 4.26 ^b	108.93 \pm 6.01 ^b
M	105.90 \pm 7.51 ^b	109.99 \pm 6.40 ^b
S	100.33 \pm 5.51 ^b	100.22 \pm 4.41 ^{bc}
FM	99.76 \pm 5.01 ^b	101.20 \pm 4.93 ^{bc}
FS	100.44 \pm 4.00 ^b	98.72 \pm 6.35 ^{bc}
FMS	93.23 \pm 0.98 ^b	91.73 \pm 4.89 ^c

¹⁾See the legend of Table 1.
²⁾Values are mean \pm SE (n = 10) Values within a column with different superscripts are significantly different at p > 0.05 by Tukey's test

서 보여진 바 있다. 본 연구에서 간조직의 lipofuscin의 함량은 TBARS의 결과와 달리 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여 군에서 lipofuscin 함량이 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮았고 특히 오디, 뽕잎 및 누에가루 3종을 혼합 투여한 FMS군에서 당뇨대조군에 비해 40%의 감소하였다 (Table 3).

3) 간 mitochondria와 microsome의 carbonyl value

활성산소에 의해서 지질과산화 뿐만 아니라 단백질 또한 쉽게 산화 된다. 지질과 단백질은 생체막에 같이 존재하므로 주된 발생 장소인 생체막에서 단백질이 활성산소에 의해 쉽게 공격받는다.⁴²⁾ 따라서 간조직에서 산화단백질의 생성 지표인 carbonyl value 함량을 mitochondria와 microsome에서 관찰하였으며 그 결과는 Table 4와 같다. 오디, 뽕잎 및 누에가루의 효과는 Table 3의 lipofuscin과 유사하였으나 오디, 뽕잎 및 누에가루를 단독으로 투여하였을 때도 효

과가 있었다는 것이 다르다. 그러나 혼합식이 투여 군에서 carbonyl value 함량이 더 감소되는 경향이었고 오디, 뽕잎 및 누에를 투여한 FMS군에서 역시 가장 낮은 값을 보였다.

이상의 실험결과로 당뇨 유발된 쥐에게 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식을 투여함으로써 노화색소 및 단백질의 산화를 유의적으로 감소시키며 이는 체내에서 지질과산화 속도가 감소하는 데 기인하는 것으로 추정된다. 이러한 지질과산화의 감소는 본 결과에서 보여 준 GSH-px와 catalase 활성의 증가와 사용한 잠상산물-오디, 뽕잎, 누에-에 함유된 플라보이드³⁷⁾ 및 기타 rutin 등 기능성 화합물⁹⁾의 작용으로 사료된다.

3. 간에서의 지질대사

1) 간조직 중의 HMG-CoA reductase의 활성

콜레스테롤 합성의 율속 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase는 당뇨상태에서는 인슐린의 부족으로 간조직에서는 활성이 감소되지만^{43,44)} 소장에서는 증가되어⁴⁵⁾ 혈중 콜레스테롤을 증가시키는 요인으로 작용한다고 알려졌다. 전보³⁷⁾에 간조직의 HMG-CoA reductase 활성이 STZ 유발 당뇨시 40% 정도 감소하였고 0.2% 뽕잎식으로 효소활성이 유의적으로 증가됨을 보고한 바 있다. Table 5에서 보는 바와 같이 본 결과에서는 0.3% 뽕잎 단독식이 (M)에서 이를 재확인 할 수 있었으며 뽕잎 뿐 아니라 오디 (F)와 누에가루 (S)도 유의적인 증가 효과를 보여 주고 이들의 복합투여 (FMS)가 가장 큰 효과를 나타냄을 보여 주고 있다. 복합효과가 우수하다는 것은 상기의 효소활성이나 과산화 산물 결과에서와 같이 당뇨로 인한 체내 비정상 상태를 전반적으로 정상화시키는 효과로 해석된다.

2) 간 조직 중의 총지질, 중성지방 및 콜레스테롤 함량

당뇨로 인하여 혈 중 중성지방과 콜레스테롤이 모두 증가되지만 간조직 중성지방은 낮아져 간조직 총지질의 감소의 주원인이 된다.³⁷⁾ 이는 인슐린 저하로 세포내로 운반되어 오는 포도당의 양 감소와 세포내 당신생 증가로 인해 간의 lipogenic enzymes의 transcription을 자극하는 glucose-6-phosphate의 양이 감소하고 이미 생성된 지방 또한 에너지원으로 이용되었기 때문인 것으로 사료된다.^{44,46)} 또한 간조직 내 glycerol-3-phosphate acyltransferase 등의 효소의 활성이 저하되고, 지방조직에서 유리된 유리지방산이 간으로 들어오는 것을 차단하여 간내 지질수준을 감소시키는 것으로 사료된다. 반면 당뇨에서 간조직 콜레스테롤 수치가 높은 것을 볼 수 있었는데³⁷⁾ HMG-CoA reductase 활성이 낮아도 에너지로 이용되지 못하는 탄수화물에서 생성된 acetylCoA가 콜레스테롤을 합성하기 때문이라고 추정된다.⁴⁷⁾ 본 연구에서 오디, 뽕잎 및 누에가루를 단독 또는 혼합투여한 후의 간조직 총지방과 중성지방 및 콜레스테롤 함량을 조사한 결과가 Table 5에 나타나 있다. 당뇨대조군에 비해 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여 군에서 총지방 및 중성지방이 유의적으로 증가되었으며 콜레스테롤은 감소하였다. 이 결과에서도 오디, 뽕잎 및 누에 3중 복합투여군인 FMS군의 효과가 가장 뚜렷하였다. HMG-CoA reductase 의 발현이 콜레스테롤에 의하여 조절되므로 FMS군에서 간조직 콜레스테롤 감소가 효소활성을 증가시키는 요인으로 작용하였을 가능성도 있다고 사료된다.

이상의 실험결과로 보아 본 연구에서는 STZ에 의한 당뇨 유발로 정상에서 변화된 간조직의 HMG-CoA reductase 활성 및 지질 함량을 오디, 뽕잎 및 누에가루 섭취로 정상화가 되는 방향으로 회복시키는 것으로 판단된다. 이는 이미 보고된 뽕잎과 누에가루 혼합물의 및 오디의 혈당

Table 5. Effects of mulberry fruit using products on hepatic HMG-CoA reductase activities, total lipid, triglyceride and cholesterol in STZ-induced diabetic rats

Groups ¹⁾	HMG-CoA reductase (nmol/mg protein/min)	Total lipid	Triglyceride (mg/g)	Cholesterol
DM	0.59 ± 0.04 ^{2)c}	42.00 ± 5.16 ^{2)c}	8.12 ± 1.13 ^c	2.64 ± 0.05 ^c
F	0.80 ± 0.08 ^b	64.91 ± 4.71 ^b	12.55 ± 1.03 ^b	2.38 ± 0.13 ^b
2F	0.75 ± 0.04 ^b	62.59 ± 4.62 ^b	12.10 ± 1.01 ^b	2.30 ± 0.19 ^{ab}
M	0.71 ± 0.05 ^b	59.33 ± 6.26 ^b	11.47 ± 1.37 ^b	2.41 ± 0.10 ^b
S	0.78 ± 0.05 ^{ab}	63.62 ± 4.94 ^b	12.30 ± 1.08 ^b	2.47 ± 0.08 ^b
FM	0.74 ± 0.07 ^{ab}	76.55 ± 8.66 ^{ab}	14.80 ± 1.55 ^{ab}	2.48 ± 0.07 ^b
FS	0.72 ± 0.05 ^b	65.22 ± 7.81 ^{ab}	12.61 ± 1.71 ^{ab}	2.46 ± 0.06 ^b
FMS	0.86 ± 0.01 ^a	78.52 ± 4.94 ^a	15.18 ± 1.08 ^a	1.70 ± 0.03 ^c

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are mean ± SE (n = 10) Values within a column with different superscripts are significantly different at p > 0.05 by Tukey's test

조절 효과가 중요하게 작용하였으리라고 생각되며 이들의 시너지 효과도 주목할 만 하다고 사료된다.

요약 및 결론

오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 당뇨쥐의 항산화효소계와 지질대사에 미치는 영향을 규명하기 위하여 Sprague-Dawley계 흰쥐에 식이로 급여하여 4주간 실험 사육한 쥐의 간 조직에서의 항산화효소의 활성도 및 지질 함량을 관찰하였다. SOD 활성은 당뇨대조군에 비해 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식을 투여한 군에서 활성이 낮은 경향이었으나 유의성은 없었다. GSH-px 활성은 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식을 투여한 군에서 당뇨대조군에 비해 활성이 유의적으로 높게 나타났으며 특히 오디, 뽕잎 및 누에를 투여한 군에서는 당뇨대조군에 비해 증가되었다. CAT 활성은 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식을 투여한 군에서 당뇨대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 특히 오디, 뽕잎 및 누에를 투여한 군에서 당뇨대조군에 비해 증가되었다. TBARS 함량은 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여한 군에서 함량이 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. Lipofuscin 함량은 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여한 군에서 함량이 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮은 경향이었고 특히 오디, 뽕잎 및 누에를 투여한 군에서 당뇨대조군에 비해 감소되었다. Carbonyl value 함량을 mitochondria와 microsome에서 관찰한 결과 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여한 군에서 carbonyl value 함량이 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮은 경향이었고 특히 오디, 뽕잎 및 누에를 투여한 군에서 당뇨대조군에 비해 감소되었다. 간 조직에서의 HMG-CoA reductase 활성은 당뇨대조군에 비해 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여한 군에서 가장 많이 증가되었으며 오디, 뽕잎 및 누에를 단독 투여한 군에서도 당뇨대조군에 비해 증가되었다. 간 조직중의 총지방과 중성지방 함량은 당뇨대조군에 비해 오디, 뽕잎 및 누에의 혼합식이 투여한 군에서 증가되었으며 콜레스테롤 함량은 감소되었다.

따라서 당뇨쥐에서 오디, 뽕잎 및 누에 혼합 식이를 투여함으로써 당뇨 상태에서 과산화물 감소, 항산화 효소 활성 증가 및 지질대사 개선효과로 인한 당뇨합병을 지연시키는 시너지 효과를 가져온 것으로 사료된다. 그러나 당뇨병에서 오디, 뽕잎 및 누에 등의 잠상산물의 혼합투여에 의한 연구는 미비한 실정이므로 보다 장기적이고 체계적인 연구가 필요하리라 사료된다.

Literature cited

- 1) Wada K, Miki H, Etoh M, Okuda T, Kusukawa R. The inhibitory effect of lipid peroxides on the activity of the membrane bound and the solubilized lipoprotein lipase. *Jan Clin J* 47: 837-842, 1983
- 2) Baynes JW. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-421, 1991
- 3) Kim KH. Effect of aminoguanidine treatment on the lipid peroxidation and antioxidative enzymes in liver and pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. Master's Thesis, Seoul National University, 1996
- 4) Rhee SJ, Choe WK, Cha BK, Yang JA, Kim KY. Effects of vitamin E and selenium on the antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutrition* 29: 22-31, 1996
- 5) Miyake Y, Yamamoto K, Tshujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on Oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 33: 689-695, 1998
- 6) Kim OK, Lee EB, Kang SS. Antihyperglycemic constituent of *Aralia elata* root bark (II). *Kor J Pharmacol* 24: 219-222, 1993
- 7) Kimur M, Chen FJ, Nakashima N, Kimura I, Asano N, Koya S. Anti-hyperglycemic effects of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Trad Med* 12: 214-219, 1995
- 8) Chem FJ, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanism of extracts from Mulberry leaves (*Folium Mori*) and cortex *mori radices* in streptozotocin induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 115: 476-482, 1995
- 9) Jang MJ, Rhee SJ. Hypoglycemic Effects of pills made of mulberry leaves and silkworm powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1611-1617, 2004
- 10) Hong V, Wrolstad. RE. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanin. *J Agric Food Chem* 38: 708-715, 1990
- 11) Yu SM, C CM. Development of Processed Foods Using Mulberry Fruit. Rural Resource Development Institute. Korea, 1996
- 12) Shin DH. Antioxidative substances in mulberry leaves. *J of Korean Oil Chemists' Soc* 16: 27-31, 1998
- 13) Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* 38: 100-107, 1996
- 14) Park JC, Choi JS, Choi JW. Effect of the fractions from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation. *Korean J Pharmacogn* 26: 377-384, 1995.
- 15) Kim SY, Park KJ, Lee WC. Antiinflammatory and antioxidative effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean J Medicinal Crop Sci* 6: 204-209, 1998
- 16) Park SW, Jung YS, Ko KC. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J Kor Soc Hort Sci* 38: 722-724, 1997
- 17) Lee WJ, Kim AJ, Kim SY. The Study on the functional materials and effects of Mulberry leaf. *Food Science and Industry* 36: 2-14, 2003

- 18) Yoo SK, Rhee SJ. Effects of YK-209 Mulberry leaves on Anti-oxidative defense system of liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1065-1070, 2002
- 19) Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Lee HS, Ryu KS. Effects of silkworm powder on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of rat. *Korean J Seric Sci* 41: 141-146, 1999
- 20) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474, 1974
- 21) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 71: 952-958, 1976
- 22) Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem* 48: 137-145, 1974
- 23) Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 90: 37-43, 1978
- 24) Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52: 1-9, 1973
- 25) Levin RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn B, Shaltiel S, Stadtmam ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, pp. 464-478, 1986
- 26) Hulcher FH, Oleson WH. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J Lipid Res* 14: 625-631, 1973
- 27) Folch JM, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 26: 497-509, 1957
- 28) Sale FD, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. Academic Press Inc, pp.347-350, 1984
- 29) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 30) Halliwell B, Gutteridge MC. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press Oxford*, pp.166-170, 1985
- 31) Yoo SK, Rhee SJ. Effects of YK-209 mulberry leaves on antioxidative defense system of liver in Streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1055-1070, 2002
- 32) Hong JH, Ahn JM, Choi SW, Rhee SJ. The effects of mulberry fruits on the antioxidative defense system and oxidative stress in the erythrocytes of Streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Sci* 7: 127-132, 2004
- 33) Mekinova D, Chorvathova V, Volkovova K, Staruchova M, Granicova E, Klvanova J, Ondreicka R. Effect of intake of exogenous vitamins C, E, β -carotene on the antioxidative status in kidney of rats streptozotocin-induced diabetic. *Nahrung* 39: 257-261, 1995
- 34) Kim MJ, Cho SY, Jang JY, Park JY, Park EM, Lee MK, Kim DJ. Effect of water extract of green tea, persimmon leaf and safflower seed on heme synthesis and erythrocyte antioxidant enzyme activities in lead-administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 191-196, 2003
- 35) Kim JH, Kwon MJ, Lee SY, Ryu JD, Moon GS, Cheigh HS, Song YO. The effect of kimchi intake on production of free radicals and anti-oxidative enzyme activities in the liver of SAM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 109-116, 2002
- 36) Shin YJ, Jung DY, Ha HK, Park SW. Anticancer effect of Erythronium japonicum extract on ICR mouse and L1210 cells with alteration of antioxidant enzyme activities. *Korean J Food Sci Tech* 36: 968-973, 2004
- 37) Hong JH, Park MR, Rhee SJ. Effects of YK-209 mulberry leaves on HMG-CoA reductase and lipid composition of liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 826-833, 2002
- 38) Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Scherthaner G. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 98: 469-475, 1995
- 39) Sunderland RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)* 90: 255-260, 1996
- 40) Jang MJ, Rhee SJ. antioxidative effects of the mixture of mulberry leaves and silkworm powder on the plasma and liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Food Sci Nutr* 9: 346-351, 2004
- 41) Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes* 40: 1241-1244, 1991
- 42) Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-15, 1986
- 43) Bhathena SJ, Avigan J, Schreiner ME. Effect of insulin on sterol and fatty acid synthesis and hydroxy-methylglutaryl CoA reductase activity in mammalian cells grown in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 2174-2178, 1974
- 44) O'Meara NMG, Devery RAM, Owens D, Collins PB, Johnson AH, Tomekin GH. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* 39: 626-633, 1990
- 45) Nakayama H, Nakagawa S. Influence of streptozotocin diabetes on intestinal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in the rat. *Diabetes* 26: 439-444, 1977
- 46) Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, Ness GC, Dugan RE, Potter JW. Stimulation of insulin of rat liver hydroxymethylglutaryl CoA reductase and cholesterol synthesizing activities. *Biochem Biophys Res Commun* 50: 704-710, 1973
- 47) Huber J, Guder W, Latzin S, Hanmprecht B. The influence of insulin and glucagon on HMG CoA reductase activity in rat liver. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 354: 795-798, 1973