

누에의 에탄올 추출물이 체내 활성산소 생성에 미치는 영향

강영국 · 최민주¹ · 남상호^{1*}

대전대학교 교양학부대학, 1: 자연과학대학 생명과학과

Effect of Ethanolic Extract of Silkworm on Reactive Oxygen Species Formation *in vivo*

Young Kook Kang, Min Joo Choi¹, Sang Ho Nam^{1*}

College of Liberal Arts, 1: Department of Biology, College of Natural Science, Daejeon University

The purpose of this study is to investigate the effects of silkworm extracts (SWE) on reactive oxygen species formation in mice (C57BL/6). Mice were administrated intraperitoneally with SWE (20 mg/kg/day) for 14 days. All animals were sacrificed 24 hours after the last SWE treatment and then extracted the blood and brain tissue in mouse. The researcher measured several parameters related to reactive oxygen species formation, malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) contents in serum, whole brain, cerebral cortex and cerebellum. The results showed that MDA content of pre-SWE treatment was decreased significantly in serum, mitochondrial and cytosolic fraction of whole brain and cerebellum (P<0.01). The H₂O₂ content of pre-SWE treatment was decreased significantly in mitochondrial fraction of whole brain, cerebral cortex and cerebellum (P<0.01). These results suggest that SWE plays an important role for inhibition of oxidative damage of cells as well as antioxidant effect, aging delay and cells protected from irradiation.

Key words : H₂O₂, silkworm, oxidative damage, antioxidant, MDA

서 론

활성산소(Reactive oxygen species; 1O₂, O₂⁻, H₂O₂)는 산소의 화학적 특성으로 인해 생성되는 산소 프리라디칼(oxygen free radical)과 이로부터 유래되는 산소화합물을 말한다. 특히 활성산소 라디칼(H₂O₂, O₂⁻)은 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의해 세포 내의 미토콘드리아, 마이크로솜, 마이크로파아지, 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈 등에서 생성되는 것으로 알려져 있다¹⁾. 이들은 탐식작용, 정보전달 및 오래된 단백질을 제거시키기 위해 체내에서 기본적으로 필요한 존재이지만 과대한 생성은 DNA, 적혈구, 세포, 조직 등의 손상시켜 질병이나 노화의 원인물질로 작용한다²⁻³⁾. 이러한 활성산소는 대기오염, 식용색소, 식품첨가물, 흡연, 음주, 스트레스, 항암제, 초음파, 우울증, 정신질환, 화공약

* To whom correspondence should be addressed at : Sang Ho Nam,

Department of Biology, College of Natural Science, Daejeon University, 62, Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, Korea

· E-mail : ykkang@dju.kr , · Tel : 042-280-2843

· Received : 2014/07/16 · Revised : 2014/08/19 · Accepted : 2014/08/21

품, 농약, 방사선 노출, 환경호르몬 및 지방의 과다한 섭취 등으로 인하여 체내에서 과도하게 생성되기 때문에 이들을 효과적으로 억제시킬 수 있는 천연물의 연구가 절대적으로 요구된다.

누에(Bombyx mori)는 누에나방과(Bombycidae)에 속하는 누에나방의 유충으로 소아의 경기를 치료하거나 기생충을 제거하는데 효과가 있다고 신농본초경(神農本草經)에 기록되어 있다. 그 외에도 이시진(李時珍)이 쓴 본초강목(本草綱目)에 “풍(風)을 다스리고 담(痰)을 부드럽게 하고 경(經)을 행할 수 있다”는 기록과 일본의 대화본초(大和本草)에도 한의학적으로 이용하였다고 기록되어 있다⁴⁾. 또한 누에의 배설물은 건조시켜 같이먹으면 진통, 관절염, 신경통, 요부냉통, 자궁출혈, 월경불순 등의 치료에 효과적이며, 술에 타 먹으면 젓이 잘 나오고 중풍, 결막염, 가려움증에도 뛰어난 효능을 지닌 것으로도 잘 알려져 있다⁵⁻⁶⁾. 기존의 연구자들은 혈당강하효과⁷⁻¹²⁾, 기관지의 점액분비 촉진효과¹³⁾, monoamine oxidase-B의 억제효과¹⁴⁾, 파킨슨병 동물모델에서 신경전달물질인 도파민의 보호효과¹⁵⁾ 등 누에의 약리학적 효능을 과학적으로 규명하였다. 최근에는 항당뇨 음료와 같은 기능성의 음료를 개발하기 위한 누에추출물의 기초 연구가 진행되었다

¹⁶⁻¹⁷). 그러나 누에 추출물(silkworm extract, SWE)과 체내 활성산소 생성에 관련된 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 누에 추출물(SWE)이 체내의 활성산소 생성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 누에의 에탄올 추출물을 20 mg/kg/day의 농도로 14일 간 생쥐의 복강에 투여한 후, MDA와 H₂O₂의 함량을 혈청과 뇌의 조직에서 정량하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에서는 acetic acid, Bovine serum albumin, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), hydrogen peroxide, hydrochloric acid, sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium hydroxide, sodium phosphate, 1,2,3,3-tetraethoxypropane, thiobarbituric acid 등 Sigma사의 제품을 이용하였다. 본 실험에서는 spectrophotometer (Beckman, DU-70), 감압농축기(Buchi, R-114), 원심분리기(Hanil HRT-60IV, Sorvall RC-28S, Beckman XL-90), luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, LS-50B), shaker (Taitec, SR-II), homogenizer (OMNI) 등을 이용하였다.

2. 누에 추출물(SWE)의 준비

농가에서 직접 구입한 5령 3일된 누에를 -20℃에서 동사시켜 분쇄한 누에 가루 200g과 70% 알코올 1L를 혼합한 다음, 초음파를 1분간 가하고 30초간 쉬는 과정을 5회 반복하였다. 그 다음에는 열에 의한 단백질의 변성을 최소화하기 위하여 4℃ 냉장실(cold room)에서 shaking water bath를 이용하여 24시간 동안 충분히 흔들여 주었다. 이 과정에서 얻은 시료를 여과시킨 후, 감압 농축하여 누에 추출물(SWE)을 얻었다.

3. 실험동물

실험동물은 생후 3개월 된 C57BL/6 계통(strain)의 웅성 생쥐(male mouse)를 이용하였다. 동물의 사육 조건은 온도 22±2℃, 습도 40-60%, 환기 12-15회/시간으로 유지하였으며, 조명은 200-300 Lux로 12시간 지속하고 나머지 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 실험동물의 사료는 조단백질 22.0%, 조지방 4.5%, 칼슘 0.7%, 인 0.5%, 조섬유 6.0%, 조회분 8.0% 및 비타민과 미네랄이 0.4% 함유된 제품의 고형사료를 공급하였다. 물은 멸균수를 충분히 공급해 주었다.

4. 동물실험

동물실험은 생리식염수(0.9% NaCl)를 14일간 생쥐의 복강에 투여한 대조군(control)과 누에 추출물(SWE)을 20 mg/kg/day의 농도로 14일간 생쥐의 복강에 투여한 실험군(SWE)으로 나누었다. 실험동물은 생리식염수나 누에 추출물(SWE)을 마지막으로 투여한 후, 24시간 절식시킨 다음, CO₂로 희생시켰다. 그 다음으로 약 500 μl의 혈액을 심장에서 채혈한 후, 곧바로 두개골을 열어 뇌(brain)를 적출하였다. 적출한 뇌 조직은 전뇌(whole brain),

대뇌피질(cerebral cortex), 소뇌(cerebellum)를 구분하여 액체질소에 곧바로 넣은 후, -70℃인 deep freezer에 보관하면서 분석하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 사전 승인(승인번호, DJUARB 2010-003)을 얻었으며, 본 위원회의 표준작업지침서(standard operation procedures; SOP)에 따라 수행하였다.

5. 혈청 분리

대조군과 누에 추출물(SWE) 투여군으로부터 채혈한 혈액을 실온에서 30분간 방치한 다음, 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 혈청(serum)으로 이용하였다.

6. 뇌조직의 미토콘드리아 분획과 세포질 분획 제조

대조군과 누에 추출물(SWE) 투여군으로부터 적출한 뇌는 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌를 구분한 후, 미토콘드리아 분획과 세포질 분획을 제조하였다. 즉, 각각의 뇌 조직을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 1:10의 비율로 넣어 균질기(homogenizer)로 균질화(homogenate)시킨 후, 원심분리(1,000 g, 10 min)하였다. 이때 얻은 상등액을 새로운 원심분리관으로 옮긴 후, 원심분리(12,000 g, 15 min)를 통하여 얻은 상등액을 세포질 분획으로 이용하였다. 위의 과정에서 얻은 pellet은 50 mM tris buffer (pH 7.4)로 2회 씻어 낸 후, 동일한 용액으로 부유(resuspension)시켜 미토콘드리아 분획으로 이용하였다. 모든 작업은 단백질의 변성을 최소화하기 위하여 4℃의 cold room에서 수행하였다. 모든 단백질은 Lowry 등¹⁸⁾의 방법을 통하여 정량하였다.

7. MDA의 함량 측정

MDA는 thiobarbituric acid와 반응하여 532 nm에서 빛을 흡수하면 complex를 형성하기 때문에 지질과산화의 지표로서 이용되는 물질이다. 본 연구에서 MDA의 함량은 Suematsu 등¹⁹⁾의 방법을 통하여 혈청, 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌에서 각각 측정하였다. 즉, 20% acetic acid 750 μl 8.1% SDS 111.25 μl, 증류수 37.25 μl, 1.2% TBA 500 μl와 혈청 100 μl를 혼합하여 100℃에서 30분간 가열하여 발색하였다. 이것을 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌의 미토콘드리아 분획과 세포질 분획에서 MDA의 함량은 각 분획의 단백질 함량을 1 mg/ml로 동일하게 보정한 후, 위의 방법에서 혈청을 대신에 각 뇌 조직액의 미토콘드리아 분획이나 세포질 분획을 100 μl 넣어 분석하였다. MDA의 표준용액은 1,2,3,3-tetraethoxypropane을 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 nmole의 농도로 제조하여 사용하였다.

8. Hydrogen peroxide의 함량 측정

H₂O₂함량은 Cathcart 등²⁰⁾의 방법을 통하여 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌에서 각각 측정하였다. 즉, 각 뇌의 미토콘드리아 분획 50 μl, 40mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 935 μl, DCFH (dichlorofluorescein) 25 μl와 1 mM FeSO₄ 10 μl를 넣은 후, 37℃에서 15분간 반응시켜 형성된 DCF(fluorescent dichlorofluorescein)

를 형광광도계(excitation; 488 nm, emission; 525 nm)를 이용하여 측정하였다. DCFH는 1 mM 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 0.5mL와 0.01N NaOH 2 mL을 혼합하여 실온에서 30 분간 반응시킨 후, 25 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 10 mL를 첨가하여 만들었다. H₂O₂의 표준용액은 H₂O₂을 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 μmole의 농도로 제조하여 사용하였다.

9. 통계처리

본 연구의 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, Student's t-test 프로그램으로 통계처리한 후, P값이 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

실험동물의 체중은 동물실험 첫째 날 누에 추출물(SWE)을 실험동물에 투여하기 직전과 14일째 누에 추출물(SWE)을 투여한 직후에 측정하였다. 그 결과 동물실험 첫째 날 대조군의 체중은 동물실험 14일 째의 체중과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 동물실험 첫째 날 누에 추출물(SWE) 투여군의 체중은 누에 추출물(SWE)을 20 mg/kg/day의 농도로 2주간 투여한 후의 체중과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1).

Table 1. Effect of SWE treatment on body weight of mice

Groups	Body Weight (g)	
	1-day	14-days
Control	23.5±1.3	23.9±1.9
SWE	23.8±1.2	24.1±1.8

Mice were administered intraperitoneally SWE (20mg/kg/day) for 14 days. Animals were sacrificed 24 hours after the last SWE treatment. Data were expressed as mean±standard deviation of 10 animals per group. Abbreviation: Control: saline treated group; SWE: silkworm ethanolic extract treated group.

2. 혈청에서 MDA의 함량 변화

대조군의 MDA 함량은 10.82±1.81 nmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 6.71±0.64 nmoles로 대조군에 비하여 약 39% 감소함을 보였다. 이러한 결과는 누에 추출물(SWE)이 지질과산화물 효과를 효과적으로 억제시킴을 보여 준 결과이다(Fig. 1).

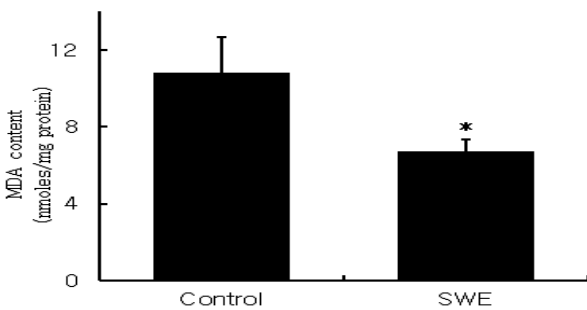


Fig. 1. Effect of SWE treatment on lipid peroxidation in the serum of mice. Blood dissected out and centrifuged at 3,000rpm for 10min. Data were expressed as mean±standard deviation of 10 animals per group and as nmoles MDA per mg protein. *Significantly different from the control group at P<0.05.

3. 뇌조직에서 MDA의 함량 변화

전뇌의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 MDA 함량은 3.41±0.41 nmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 2.15±0.21 nmoles로 대조군에 비하여 약 37% 감소함을 보였다. 그리고 세포질 분획에서 대조군의 MDA 함량은 3.62±0.22 nmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 2.59±0.15 nmoles로 대조군에 비하여 약 28% 감소함을 보였다(Fig. 2).

대뇌피질의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 MDA 함량은 2.08±0.13 nmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 2.05±0.21 nmoles로 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 그리고 세포질 분획에서 대조군의 MDA 함량은 1.38±0.04 nmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 1.39± 0.08 nmoles로 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 소뇌의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 MDA 함량은 2.52±0.11 nmoles이었고, 누에 추출물 (SWE) 투여군은 2.15±0.29 nmoles로 대조군에 비하여 약 15% 감소함을 보였다. 그리고 세포질 분획에서 대조군의 MDA 함량은 2.39±0.07 nmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 2.11± 0.05 nmoles로 대조군에 비하여 약 11% 감소함을 보였다(Fig. 4).

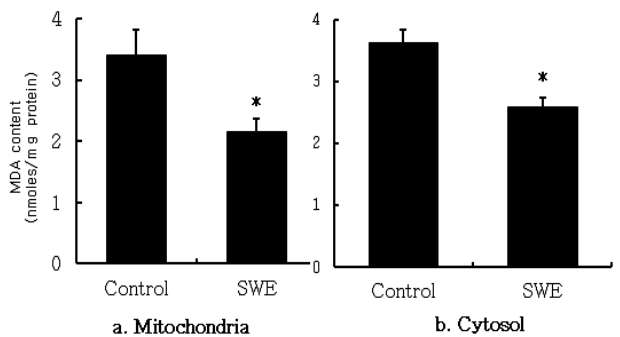


Fig. 2. Effect of SWE treatment on MDA contents in the whole brain mitochondrial (a) and cytosolic (b) fraction of mice. The data were expressed as mean±standard deviation of seven repeated experiments using samples pooled from 7 mice. Data expressed as nmoles MDA per mg protein. *Significantly different from the control group at P<0.05.

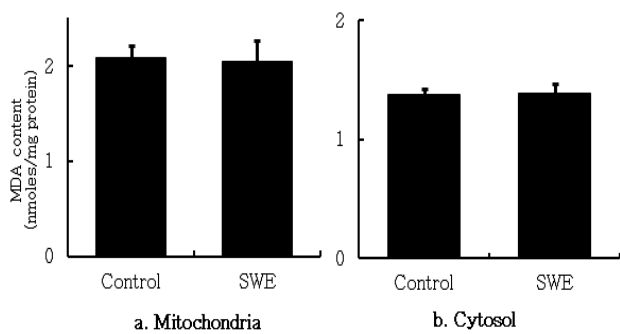


Fig. 3. Effect of SWE treatment on MDA contents in the cerebral cortex mitochondrial (a) and cytosolic (b) fraction of mice. The data were expressed as mean±standard deviation of seven repeated experiments using samples pooled from 7 mice. Data expressed as nmoles MDA per mg protein.

4. 뇌 조직에서 hydrogen peroxide(H₂O₂)의 함량 변화

전뇌의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 H₂O₂ 함량은

60.25±1.62 μmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 52.22±1.14 μmoles로 대조군에 비하여 약 13% 감소함을 보였다. 대뇌피질의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 H₂O₂ 함량은 62.76±3.17 μmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 49.61±2.35 μmoles로 대조군에 비하여 약 21% 감소함을 보였다. 소뇌의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 H₂O₂ 함량은 93.61±4.21 μmoles이었고, 누에 추출물(SWE) 투여군은 81.32±2.31 μmoles로 대조군에 비하여 약 13% 감소함을 보였다(Fig. 5).

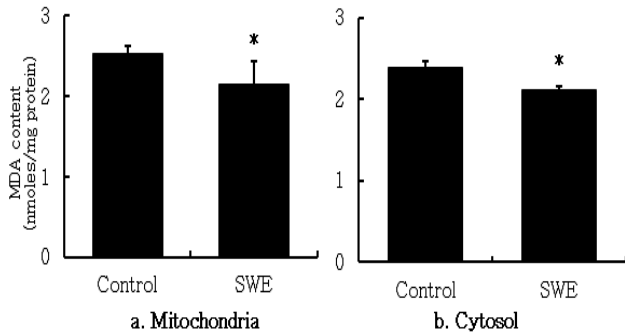


Fig. 4. Effect of SWE treatment on MDA content in the cerebellum mitochondrial (a) and cytosolic (b) fraction of mice. The data were expressed as mean±standard deviation of seven repeated experiments using samples pooled from 7 mice. *Significantly different from the control group at P<0.05.

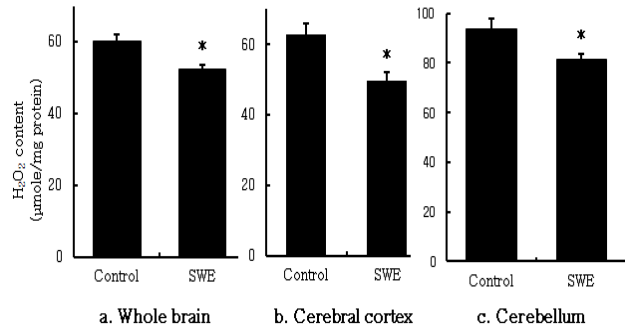


Fig. 5. Effect of SWE treatment on hydrogen peroxide content in the whole brain (a), cerebral cortex (b) and cerebellum (c) mitochondrial fraction of mice. The data were expressed as mean±standard deviation of seven repeated experiments using samples pooled from 7 mice. *Significantly different from the control group at P<0.05.

고 찰

누에(*Bombyx mori*)의 유충인 번데기는 예로부터 구황(救荒)음식으로 중국, 태국, 한국 등에서 이용되었으며, 목병, 백일 기침, 젓먹이 아이의 경기(驚氣), 뇌막염 등을 치료하는데 활용되었던 기록이 동의보감에 남아 있을 정도로 한의학적으로 널리 이용된 약용곤충이다⁹⁾.

실험동물의 체중, 장기의 무게, 털의 색, 운동성 등은 실험동물의 생리학적 변화를 나타내는 일반적인 지표로 활용된다. 이러한 지표들은 다이옥신, 환경호르몬 등의 세포독성을 평가하는 중요한 요소로 활용된 바 있다²¹⁻²²⁾. 최근의 연구에서는 누에분말을 흰쥐(*rat*)에 경구투여한 결과, 사망률, 일반 증상, 체중 변화 및

부검소견 등에서 큰 이상을 보이지 않았다²³⁾. 본 연구자는 누에 추출물을 20 mg/kg의 농도로 2주간 생쥐의 복강에 투여하였을 때, 체중, 간 및 뇌의 무게에 영향을 주지 않음을 선행의 연구에서 이미 규명한 바 있다¹⁵⁾. 본 연구에서도 기존의 결과와 유사한 것으로 보아 누에 추출물(SWE)이 실험동물에 독성물질로 작용하지 않음을 다시 한 번 확인시켜 준 의미 있는 결과라고 생각된다(Table 1).

활성산소는 미토콘드리아 내의 산화적 인산화반응(oxidative phosphorylation)이나 지방산의 β-산화(β-oxidation)과 같은 정상적인 대사과정에서 생성된다. 하지만 활성산소는 방사선이나 화학물질의 노출, 지질과산화, 유전체의 불안정(genome instability) 및 유전자의 돌연변이(gene mutation) 등에 의해 세포에서 과도하게 생성되어 세포질, 핵산, 단백질 등을 손상시켜 노화, 성인병, 세포의 손상을 유발하는 주범으로 작용한다²⁴⁻²⁷⁾. 그러므로 이들을 효과적으로 제거시킬 수 있는 천연물이나 생체 방어효소에 대한 연구가 최근에 진행되고 있다. 특히 누에추출물은 활성산소 중에서 독성이 가장 강한 히드록실 라디칼(hydroxyl radical)과 LDL-콜레스테롤, 동맥경화지수, 지질과산화 등을 효과적으로 억제시킬 뿐만 아니라 생체의 방어효소인 슈퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase, SOD)의 활성도 증가시켜 노화를 방지할 수 있다고 밝혔다²³⁾.

따라서 본 연구에서는 지질과산화와 활성산소를 측정할 수 있는 지표들을 실험동물의 혈액과 뇌의 조직에서 정량함으로써 누에 추출물(SWE)이 체내 활성산소 생성에 미치는 효능을 규명하고자 한다. MDA의 함량은 누에 추출물(SWE)을 실험동물에 처리함에 따라 혈청과 뇌 조직에서 유의적으로 감소함을 보였다(Fig. 1, 2, 4). H₂O₂는 dichlorofluorescein (DCFH)를 fluorescent dichlorofluorescein (DCF)로 산화시킨다^{28,29)}. 그러므로 본 연구자는 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌에서 DCF를 정량하는 간접적인 방법으로 H₂O₂를 정량하였다. H₂O₂의 함량은 누에 추출물(SWE)을 실험동물에 처리함에 따라 전뇌(whole brain), 대뇌피질(cerebral cortex) 및 소뇌(cerebellum)에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소함을 보였다(Fig. 5).

이상의 결과를 볼 때, 누에 추출물(SWE)은 체내 활성산소의 과도한 생성을 억제함으로써 세포 내의 단백질, 핵산, 지질의 과산화를 억제시킬 것으로 사료되며, 노화를 지연시키고, 자외선이나 방사선과 같은 유해물질로부터 세포를 보호할 것으로 사료된다.

결 론

누에추출물이 체내 활성산소의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 누에 추출물(SWE)을 실험동물에 투여한 후, 체중 변화, MDA 및 H₂O₂의 함량을 분석하여 다음과 결과를 얻었다. 누에 추출물(SWE)이 음성 생쥐(male mouse, C57BL/6)의 혈청과 뇌 조직에서 MDA와 과산화수소(H₂O₂)의 함량을 유효하게 감소시키는 것으로 볼 때, 누에 추출물(SWE)은 노화, 성인병, 독성물질, 방사선 노출 등으로 인한 체내 활성산소의 과도한 생성을 억제시킬 뿐만 아니라 세포의 산화적 손상을 감소시키는 것을 입증

한 결과이다.

References

1. 최병기, 정세영, 박광식, 조정희. 활성산소와 질환. 서울. 신일상사출판사. pp 7-15, 2004.
2. Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys. 247: 1-15, 1986.
3. Miquel, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. CRC Press. Florida. 1: 3-16, 1989.
4. Choi, J.H., Kim, D.I., Park, S.H., Back, S.J., Kim, N.J., Ryu, K.S. Development of anti-diabetes drink using with silkworm(*Bombyx mori*) extract. Kor J Seric Sci. 45(2):96-102, 2003.
5. 김창호. 산업곤충. 진주. 경상대학교출판부. pp 23-28, 1995.
6. 남중희, 마영일. 여러 나라 곤충의 자원화와 그 이용. 서울. 서울대학교 출판부. p 108, 176, 2010.
7. Chung, S.H., Ryu, J.H., Kim, I.J. Blood glucose lowering of silkworm. J HyungHee Pharm. 24: 95-100, 1996.
8. Cho, M.R., Choue, R.W., Chung, S.H., Ryu, J.W. Effects of silkworm powder on blood glucose and lipid levels in NIDDM (type-II) patients. Kor J Nutr 31(7):1139-1150, 1998.
9. Ryu, K.S., Lee, H.S., Chung, S.H., Kang, P.D. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative conditions of silkworm power. Kor J Seric Sci. 39(1):79-85, 1997.
10. Kim, S.H., Kim, K.S., Lee, J.H., Chung, E.K., Park, Y.S., Park, Y.J., Lee, H.Y. Comparison of glucose-lowering activity of the extracts from Kangwon-do mountain mulberry leaves(*Moli folium*) and silkworm. Kor J Appl Microbiol Biotechnol. 25(4):391-395, 1997.
11. Kim, M.S., Choue, R.W., Chung, S.H., Koo, S.J. Blood glucose lowering effects mulberry leaves and silkworm extracts an mice fed with high-carbohydrate diet. Kor Nutr Society. 31(2): 117-125, 1998.
12. Kang, Y.K., Choo, S.K., Nam, S.H. Effects of silkworm-extract on blood components levels in mice. Kor J Entomol. 31(4):243-247, 2001.
13. Kang, Y.K., Lim, H.B., Sohn, H.O., Lee, Y.G., Lee, D.W., Nam, S.H. Effect of silkworm-extract on mucus secretion in rat tracheobronchial lumen. Kor J Entomol. 30(2): 71-75, 2000.
14. Kang, Y.K., Nam, S.H., Sohn, H.O., Lee, D.W. Inhibitory effects of silkworm-extract (SE) on monoamine oxidase activity in vitro and in vivo. Entomol Res. 35(3):189-193, 2005.
15. Kang, Y.K., Oh, H.S., Cho, Y.H., Kim, Y.J., Han, Y.G., Nam, S.H. Effects of a silkworm extract on dopamine and monoamine oxidase-B activity in an MPTP-induced Parkinson's disease model. Lab Anim Res. 26(3):287-292, 2010.
16. Kim, E.J., Kim, S.H., Kim, S.M. Development of a beverage using the extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizome* and *Inonotus obliquus*. Kor J Food Preserv. 18(6):844-852, 2011.
17. Choi, J.H., Kim, D.I., Park, S.H., Back, S.J., Kim, N.J., Ryu, K.S. Development of anti-diabetes drink using with silkworm (*Bombyx mori* L.) extract. Kor J Seric Sci. 45(2):96-102, 2003.
18. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurment with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-275, 1951.
19. Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., Yagi, K. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. Clin Chem Acta. 79: 267-270, 1977.
20. Cathcart, R., Schwiers, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. Anal Biochem. 134: 111-116, 1983.
21. Van Birgelen, A.P.J.M., Hebert, C.D., Wenk, M.L., Grimes, L.K., Chapin, R.E., Mahler, J., Travlos, G.S., Bucher, J.R. Toxicity of 3,3,4,4-tetrachloroazobenzene in rats and mice. Toxicol and Appl Pharmacol. 156(2):147-159, 1999.
22. Walker, N.J., Tritscher, A.M., Sills, R.C., Lucier, G.W., Portier, C.J. Hepatocarcinogenesis in female Sprague-Dawley rata following discontinuous treatment with 2,3,7,8- etrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol Sci. 54(2):330-337, 2000.
23. 류강선. 우리들은 당뇨병을 극복했다. 서울. 오성출판사. pp 52-58, 2009.
24. Knopowski, J., Wiczorowska-Tobis, K., Witowski, J. Phtho-physiology of aging. J physiol Phamacol. 53(2):135-146, 2002.
25. Martin, G.M., Austad, S.N., Johnson, T.E. Genetic analysis of aging: Role of oxidative damage and environmental stress. Nature Genetics. 13: 25-34, 1966.
26. Berlett, S.S., Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. J Biol Chem. 272: 20313-20316, 1997.
27. Finkel, T., Halbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. Nature 408: 239-247, 2000.
28. Black, M.J. and Brandt, R.B. Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. Anal Biochem. 58: 246-254, 1974.
29. Keston, A.S., Brandt, R.B. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. Anal Biochem. 11: 1-5, 1965.