

커피가루 첨가식이가 당뇨 쥐의 혈당 및 간 조직 항산화효소 활성에 미치는 영향

배지현¹ · 정윤정² · 최미자^{2†}

계명대학교 약학대학원,¹ 계명대학교 식품영양학과²

Effects of coffee powder supplementation on the blood glucose and antioxidative enzyme activity of liver tissue in STZ-induced diabetic rats

Bae, Jihyun¹ · Jung, Yun-Jung² · Choi, Mi-Ja^{2†}

¹The Graduate School of Pharmacy, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Department of Food and Nutrition, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the role of coffee in diabetic rats in order to prevent hyperglycemia and hyperlipidemia, and to improve antioxidant enzyme activity in streptozotocin induced diabetic rats. **Methods:** Thirty two male Sprague–Dawley rats (body weight 200 ± 5 g) were divided into two groups; diabetic and nondiabetic groups. The groups were each randomly divided into two subgroups; fed control and coffee (5 g coffee powder/kg diet) diets. Diabetes was induced by intramuscular injection of 50 mg streptozotocin/kg body weight. Rats with blood glucose concentrations ≥ 300 mg/dL were considered diabetic for these experiments. All rats were fed an experimental diet and deionized water ad libitum for 4 weeks. **Results:** The results of this study indicate that body weight gain was significantly lower in diabetic groups than in nondiabetic groups regardless of diet. Mean food intake was significantly higher in diabetic groups than in nondiabetic groups, and significantly higher in the coffee group than in the control group in diabetic rats. Food efficiency ratio (FER) was significantly lower in diabetic groups than in nondiabetic groups regardless of diet. The fasting blood glucose of coffee supplemented groups was significantly lower compared with the control group in diabetic and nondiabetic rats. The levels of serum LDL-cholesterol and atherogenic index were significantly lower in the coffee group than in the control group in diabetic and nondiabetic rats, and serum HDL-cholesterol was significantly higher in the coffee group than in control groups. The contents of hepatic triglyceride were significantly lower in the coffee group than in the control group in diabetic and nondiabetic rats. The lipid peroxidation of malondialdehyde (MDA) contents was significantly lower in the coffee group than in the control group in diabetic and nondiabetic rats. Activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase in liver was not significantly different by experimental diets among all groups. **Conclusion:** In conclusion, effects of 0.5% coffee powder supplemented diet were beneficial on blood glucose and lipids in diabetic rats.

KEY WORDS: diabetic rats, coffee powder, blood glucose, lipid peroxidation, antioxidative enzyme activity

서 론

우리나라 30세 이상 성인의 당뇨병 유병율은 2001년 8.6% (남자 9.5%, 여자 7.9%)에서 최근 10년간 약 9% 수준을 유지하다가 2013년 11.0% (남자 12.8%, 여자 9.1%)로 증가하였다. 고콜레스테롤혈증은 2001년 9.1% (남자 8.5%, 여자 9.6%), 2013년 14.9% (남자 13.6%, 여자 15.9%)였으며, 고중성지방혈증은 2001년 19.6% (남자 28.2, 여자 14.5%), 2013년 17.1% (남자 23.8%, 여자

10.9%)로 나타나 고콜레스테롤혈증 유병율도 증가추세를 보이고 있다.¹ 최근 10여년간 우리나라 만성질환 유병율 추이에서 나타난 것처럼 각종 질환의 유병율이 증가하고 있는데 이러한 만성질환 중 당뇨병은 고지혈증, 이상지혈증, 인슐린 저항성, β-세포기능 및 인슐린분비 손상 같은 다양한 문제를 수반하는 자가염증성 증상으로² 특히 다양한 증상 관리가 필요한 질환이다. 당뇨병에서는 포도당과 당화단백질의 산화와 관련되어 나타나는 여러 가지 인자들이 free-radical의 생성을 증가시켜 다양한 항산화 방어기

Received: February 23, 2015 / Revised: March 18, 2015 / Accepted: March 25, 2015

[†]To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-53-580-5874, e-mail: choimj@kmu.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

전과 항산화활성의 감소가 관찰되었다.³

커피는 다양한 성분을 함유하고 있는데 이 중 polyphenol 계의 클로로젠산 (chlorogenic acid)와 caffeic acid와 non-polyphenol계의 caffeine, trigonelline, nicotinic acid, 5-hydroxymethyl furfuraldehyde 등이 함유되어 있어 다양한 생리활성 및 항산화작용을 하는 것으로 알려져 있다.⁴ 클로로젠산은 커피의 대표적인 항산화 물질로 최근 카페인 성분과 함께 주목받고 있다. 일반적으로 커피 100 g 안에 2~5 g의 클로로젠산이 있는데 이것은 커피의 중요성분으로 사람과 동물 연구에서 항산화활성을 확인하였다.⁵ 커피 섭취와 당뇨병 위험과의 관련성을 연구한 선행연구를 살펴보면, Van Dam과 Feskens 연구⁶는 커피 섭취가 높을수록 당뇨병의 발병 위험이 낮아진다고 보고하였고, 커피 섭취와 당뇨병 관련성 코호트 연구에서도 하루에 커피 6잔 이상을 마시는 경우 하루에 2잔 이하와 비교하여 제2형 당뇨병의 위험이 35% 낮아진다고 보고하였다.⁷

그러나 커피 섭취와 혈중 콜레스테롤 수준은 양의 상관성이 보고되었는데 커피에 함유된 카페인 성분이 혈중 지질 농도 증가에 관여하는 것으로 보여지며, 메타분석 연구에서도 커피 섭취가 높을수록 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤, 중성지방 농도를 증가시키는 것으로 보고하였다.⁸ 반면, 9년간 커피를 섭취한 성인 (평균연령 36세)에서는 혈중 중성지방 및 HDL-콜레스테롤 농도에 유의적인 영향이 없는 것으로 나타났다.⁹

최근 커피 섭취와 당뇨병, 혈중지질농도 및 비만 등 대사질환 관련 위험 지표와의 관련성을 보고한 선행연구 결과에서 커피의 다양한 작용이 보고되었으나 역학연구의 경우 커피 종류나 커피 섭취 시 기호도에 따른 설탕이나 크림 첨가 여부 등 커피섭취 형태 조사가 구체적으로 이루어지지 않았기 때문에 실질적인 커피섭취의 효과인지 명확하게 규명되지 못하고 있는 실정이며, 커피 추출 방식에 따라 서로 커피 유효성분 함량의 차이로 인해 혈중 지질 수준에 미치는 영향이 상이하었다.

따라서 본 연구에서는 streptozotocin (STZ) 유발 당뇨 쥐에게 일반 인스턴트커피보다 클로로젠산이 강화된 인스턴트 커피분말을 식이에 직접 보충한 0.5% 커피가루 첨가식을 섭취시켜 혈당, 혈중 지질 농도, 간 지질함량 및 간의 항산화효소 활성에 미치는 영향을 분석하였다.

연구방법

실험동물

Sprague-Dawley 수컷 쥐 (평균 체중 200 ± 10 g)를 (주)오리엔트로부터 분양받아 실험식을 시작하기 전 1주일간

의 적응 기간 동안 고형사료로 사육한 후 난괴법을 이용하여 각 군당 8마리씩 4군 (Non-Diabetic control군, Non-Diabetic coffee군, Diabetic control군, Diabetic coffee군)으로 나누어 4주간 실험식을 공급하였다. 실험동물은 stainless-steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 온도는 25 ± 2°C, 습도는 63 ± 5%로 유지하고 매일 광주기, 암주기를 12시간 간격으로 자동 조절 장치를 이용하여 조절하였다. 식이와 물은 자유롭게 섭취 (ad libitum)하게 하고 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다. 동물실험의 전 과정은 실험동물 윤리 규정에 근거하여 실험을 실시하였다.

당뇨 유발

실험동물의 평균 체중이 약 200 g 되었을 때 streptozotocin (Sigma S0130) 50 mg/kg body weight을 0.25 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해하여 대퇴부 근육에 1회 주사하여 실험적으로 당뇨를 유발하였고, 대조군은 동량의 citrate buffer 용액을 주사하였다. 당뇨유발의 확인은 streptozotocin 주사 4일 후 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당이 300 mg/dL 이상인 동물을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 4주간 사육하였다.

실험식이

실험식의 조성은 Table 1에 나타내었다. 실험식에 첨가한 커피는 당뇨병환자에게 3년간 하루에 커피 5잔 이상 섭취시켰을 경우 혈당이 유의적으로 감소하였다는 보고와¹⁰ 커피 섭취가 증가할수록 혈중 지질농도가 감소하

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredient	Dietary group	
	Control	Coffee
Corn starch	529.5	524.5
Sucrose	100	100
Casein ¹⁾	200	200
Soybean oil	70	70
Cellulose ²⁾	50	50
Mineral-mix ³⁾	35	35
Vitamin-mix ⁴⁾	10	10
L-Cystine ⁵⁾	3.0	3.0
Choline bitartrate ⁶⁾	2.5	2.5
TBHQ ⁷⁾	0.014	0.014
Coffee ⁸⁾	-	5.0

1) Casein, Maeil Dairy industry Co. Ltd. Pyungtaek- City, Kyunggi-Do, Korea 2) α -Cellulose, supplied by SIGMA Chemical company 3) AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA 4) AIN-93-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA 5) L-Cystine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA 6) Choline bitartrate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA 7) Tert-butyl Hydroquinone, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA 8) Maxim well-being polyphenol coffee, Dongsuh, Co., Ma-fu, Seoul, Korea

였다는 선행연구¹¹에 근거하여 커피가루를 식이의 0.5% (커피가루 0.5 g/100 g diet)로 AIN-93G 기본조성¹²에 기준하여 첨가하였다.

체중, 식이섭취량 및 식이효율

체중은 일주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 식이섭취량은 이틀에 한 번씩 측정하였으며, 식이효율 (food efficiency ratio)은 4주간의 실험기간동안 평균 식이섭취량을 체중증가량으로 나누어 계산하였다.

혈당, 혈중지질 및 간지질 함량 분석

혈중 포도당 농도는 oxidase법을 이용한 glucose kit (Daiichi, Japan)을 사용하여 auto analyser (Hitachi 7170, Japan)로 분석하였다. 혈청 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 농도는 kit (Asan Pharmaceutical, Korea)로 spectrophotometer (Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 혈청 LDL-콜레스테롤은 Friedewald 등의 방법¹³을 이용하여 산출하였다. 간 조직의 중성지방과 콜레스테롤의 추출은 Folch법¹⁴을 응용하여 혈청 중성지방과 콜레스테롤 분석과 동일한 방법으로 분석하였다. 동맥경화지수인 atherogenic index는 동맥경화의 위험을 예측할 수 있는 변인으로 산출방법은 다음과 같다.

$$\text{Atherogenic index} = (\text{total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}$$

간 항산화효소 활성 분석

Catalase (CAT) 활성은 간 조직 중 mitochondria 분획은 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 기질로 하여 환원되는 정도를 240 nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi 방법¹⁵에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직의 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안에 반응하여 감소시킨 H₂O₂ 양을 nmole로 표시하였다. (Reduced H₂O₂ nmole/mg protein/min) 간 조직 중 glutathione peroxidase (GPx) 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법¹⁶에 따라 측정하였다. Glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시켜 340 nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다. (NADPH oxidized nmole/mg protein/min) 간조직 중 superoxide dismutase (SOD) 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin 등의 방법¹⁷에 준해 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산 완충액 (pH 7.5)에

10 μM hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성을 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 액 중의 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 나타내었다 (Unit/mg protein/min (50% inhibition of autooxidation of hematoxylin)).

Malondialdehyde 함량

간 조직 중의 malondialdehyde (MDA)는 Ohkawa¹⁸의 방법에 따라 측정하였다. 혈액을 제거한 간 절편을 마쇄하여 homogenate를 만든 후 0.8% TBA 1 mL와 1 mM FeSO₄ in 20% TCA 0.5 mL와 D.W 1.3 mL를 첨가한 다음 잘 혼합하여 98°C 수욕 조에서 30분 동안 반응 시킨 후 바로 냉각하였다. 냉각한 tube에 n-butanol 5 mL을 가하여 잘 섞고 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였고, 지질과산화물 수준은 간조직의 nmol MDA/g 로 나타내었다.

통계처리

본 실험결과는 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.3 :SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 각 실험변수는 평균과 표준편차를 구하였으며, ANOVA test로 각 군 간의 통계적 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 검증하였다.

결 과

커피첨가식이 당뇨병 쥐의 체중증가량 및 식이섭취량에 미치는 영향

커피첨가식이 섭취에 따른 실험동물의 체중변화를 Table 2에 나타내었다. 실험시작 시 체중은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었고 실험종료 시 체중은 당뇨병군내에서 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았으며, 실험기간동안 체중증가량은 당뇨병군이 비당뇨군보다 유의적으로 낮았으나 커피첨가식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 4주간의 실험기간 동안 실험동물의 평균 식이섭취량과 식이효율을 Table 3에 나타내었다. 평균 식이섭취량은 당뇨병군이 비당뇨군보다 유의적으로 높았고 비당뇨군내에서는 대조군과 커피군 간에 유의적인 차이는 없었으나, 당뇨병군내에서는 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았다. 식이효율은 당뇨병군이 비당뇨군보다 유의적으로 낮았으나 커피 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다.

Table 2. The effect of coffee powder on body weight gain in diabetic rats

Group	Non-Diabetic rats		Diabetic rats	
	Control	Coffee	Control	Coffee
Initial weight (g)	215.7 ± 4.8 ¹⁾	215.2 ± 3.5	208.2 ± 17.0	215.2 ± 14.0
Final weight (g)	381.8 ± 19.7 ^{a2)}	387.1 ± 25.8 ^a	215.2 ± 37.7 ^c	247.8 ± 13.1 ^b
Weight gain (g)	166.1 ± 21.2 ^a	171.9 ± 27.2 ^a	7.0 ± 25.3 ^b	32.5 ± 13.7 ^b

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. The effect of coffee powder on food intake and food efficiency ratio (FER) in diabetic rats

Group	Non-Diabetic rats		Diabetic rats	
	Control	Coffee	Control	Coffee
Mean food intake (g/day)	22.5 ± 2.2 ^{1)c2)}	22.9 ± 2.7 ^c	29.6 ± 6.2 ^b	35.8 ± 5.1 ^a
FER	0.3370 ± 0.0528 ^a	0.3396 ± 0.0219 ^a	0.0036 ± 0.0468 ^b	0.0444 ± 0.0201 ^b

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. The effect of coffee powder on fasting glucose and serum lipid concentrations in diabetic rats

Group	Non-Diabetic rats		Diabetic rats	
	Control	Coffee	Control	Coffee
Blood Glucose (mg/dL)	116.5 ± 31.4 ^{1)c2)}	105.0 ± 29.7 ^d	366.0 ± 55.2 ^a	295.4 ± 49.7 ^b
Total cholesterol (mg/dL)	114.8 ± 11.3	104.8 ± 13.1	115.9 ± 9.9	110.3 ± 8.2
Triglyceride (mg/dL)	71.1 ± 8.2	64.1 ± 16.5	73.9 ± 11.3	69.8 ± 13.0
HDL - cholesterol (mg/dL)	17.8 ± 2.8 ^b	19.5 ± 2.5 ^a	14.7 ± 4.6 ^c	17.9 ± 3.2 ^b
LDL - cholesterol (mg/dL)	111.2 ± 10.9 ^b	98.0 ± 15.3 ^c	116.0 ± 9.8 ^a	106.3 ± 10.2 ^b
Atherogenic index	5.5 ± 0.9 ^b	4.4 ± 1.2 ^c	7.6 ± 2.8 ^a	5.4 ± 1.7 ^b

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

커피첨가식이가 당뇨 쥐의 혈당에 미치는 영향

커피첨가식이가 당뇨 쥐의 혈당에 미치는 영향을 Table 4에 나타내었다. 비당뇨군에서 대조군 116.5 ± 31.4 mg/dL, 커피군 105.0 ± 29.7 mg/dL, 당뇨군내에서 대조군 366.0 ± 55.2 mg/dL, 커피군 295.4 ± 49.7 mg/dL로 당뇨군의 혈당이 비당뇨군보다 유의적으로 높았고, 당뇨군과 비당뇨군 모두 커피군이 대조군보다 혈당이 유의적으로 낮아 커피의 섭취가 당뇨 쥐의 혈당을 낮추는 것으로 나타났다.

커피첨가식이가 당뇨 쥐의 혈중 지질농도에 미치는 영향

커피첨가식이가 당뇨 쥐의 혈중지질 농도에 미치는 영향을 분석한 결과 (Table 4), 혈중 총 콜레스테롤농도는 비당뇨군내에서 대조군 114.8 ± 11.3 mg/dL, 커피군 104.8 ± 13.1 mg/dL, 당뇨군내에서 대조군 115.9 ± 9.9 mg/dL, 커피군 110.3 ± 8.2 mg/dL이었고, 혈중 중성지방 농도는 비당뇨군내에서 대조군 71.1 ± 8.2 mg/dL, 커피군 64.1 ± 16.5 mg/dL, 당뇨군내에서는 대조군 73.9 ± 11.3 mg/dL, 커피군 69.8 ± 13.0 mg/dL로 커피섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다.

혈중 HDL-콜레스테롤농도는 비당뇨군에서 대조군 17.8

± 2.8 mg/dL, 커피군, 19.5 ± 2.5 mg/dL, 당뇨군에서 대조군 14.7 ± 4.6 mg/dL, 커피군 17.9 ± 3.2 mg/dL로 비당뇨군과 당뇨군 모두 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았다. 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 비당뇨군에서 대조군 111.2 ± 10.9 mg/dL, 커피군 98.0 ± 15.3 mg/dL, 당뇨군에서 대조군 116.0 ± 9.8 mg/dL, 커피군 106.3 ± 10.2 mg/dL로 비당뇨군과 당뇨군 모두 커피군이 대조군보다 유의적으로 낮았다. 동맥경화지수 (atherogenic index)는 동맥경화 예견지표로 사용되는데 비당뇨군에서 대조군 5.5 ± 0.9, 커피군 4.4 ± 1.2, 당뇨군에서 대조군 7.6 ± 2.8, 커피군 5.4 ± 1.7로 커피군이 유의적으로 낮았다.

커피첨가식이가 당뇨 쥐의 간 지질 및 과산화지질 함량에 미치는 영향

간 지질 함량

커피첨가식이가 당뇨 쥐의 간 지질 함량에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 간의 중성지방함량은 비당뇨군에서 대조군 35.1 ± 2.0 mg/g, 커피군 30.4 ± 0.8 mg/g, 당뇨군에서 대조군 24.6 ± 1.3 mg/g, 커피군 21.7 ± 1.4 mg/g로 비당뇨군과 당뇨군 모두 커피군이 대조군보다 유의

Table 5. The effect of coffee powder on the liver lipid and malondialdehyde content in diabetic rats

Group	Non-Diabetic rats		Diabetic rats	
	Control	Coffee	Control	Coffee
Triglyceride (mg/g)	35.1 ± 2.0 ^{1)a2)}	30.4 ± 0.8 ^b	24.6 ± 1.3 ^c	21.7 ± 1.4 ^d
Total cholesterol (mg/g)	40.8 ± 2.5 ^b	39.0 ± 1.8 ^b	44.8 ± 1.8 ^a	43.6 ± 0.4 ^a
Malondialdehyde (nmolMDA/g)	3.26 ± 0.4 ^a	2.87 ± 0.17 ^b	3.15 ± 0.18 ^{ab}	3.04 ± 0.05 ^{ab}

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 6. The effect of coffee powder on the liver activities of SOD, GPx, catalase in diabetic rats

Group	Non-Diabetic rats		Diabetic rats	
	Control	Coffee	Control	Coffee
SOD (unit/mg protein/min)	4.62 ± 6.87 ¹⁾	5.53 ± 5.19	4.72 ± 2.58	5.03 ± 2.10
GPx (nmol NADPH/mg protein/min)	14.32 ± 5.05	17.38 ± 6.61	13.77 ± 6.07	18.82 ± 1.90
Catalase (nmole H ₂ O ₂ reduced/mg protein/min)	50.94 ± 17.09 ^{ab}	63.19 ± 13.09 ^a	35.31 ± 17.54 ^b	43.50 ± 2.24 ^b

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

적으로 낮았다. 간의 콜레스테롤 함량은 비당뇨군에서 대조군 40.8 ± 2.5 mg/g, 커피군 39.0 ± 1.8 mg/g, 당뇨군에서 대조군 44.8 ± 1.8 mg/g, 커피군 43.6 ± 0.4 mg/g 으로 당뇨군이 비당뇨군보다 유의적으로 높았고 커피섭취에 따른 차이는 없었다.

간 과산화지질 함량

커피첨가식이 섭취에 따른 당뇨 쥐의 간조직의 과산화지질인 MDA 함량에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 간조직의 MDA 함량은 비당뇨군에서 대조군 3.26 ± 0.40 nmolMDA/g, 커피군 2.87 ± 0.17 nmolMDA/g, 당뇨군에서 대조군 3.15 ± 0.18 nmolMDA/g, 커피군 3.04 ± 0.05 nmolMDA/g으로 비당뇨군내에서 커피군이 대조군보다 유의적으로 낮았고 당뇨군내에서는 커피섭취에 따른 차이가 없었다.

커피첨가식이 당뇨 쥐의 간조직의 항산화효소 활성에 미치는 영향

커피첨가식이 당뇨 쥐의 항산화효소인 SOD, GPx 및 CAT 활성에 미치는 영향을 Table 6에 나타내었다. 간조직의 SOD활성은 비당뇨군의 대조군 4.62 ± 6.87 unit/mg protein/min, 커피군 5.53 ± 5.19 unit/mg protein/min, 당뇨군내에서 대조군 4.72 ± 2.58 unit/mg protein/min, 커피군 5.03 ± 2.10 unit/mg protein/min으로 당뇨유무 및 커피섭취 여부에 따른 유의적인 차이가 없었다. GPx 활성은 비당뇨군에서 대조군 14.32 ± 5.05 nmol NADPH/mg protein/min, 커피군 17.38 ± 6.61 nmol NADPH/mg protein/min, 당뇨군에서 대조군 13.77 ± 6.07 nmol NADPH/mg protein/min, 커피군 18.82 ± 1.90 nmol NADPH/mg protein/min으로

로 유의적인 차이가 없었다. CAT 활성은 비당뇨군에서 대조군 50.94 ± 17.09 nmol H₂O₂ reduced/mg protein/min, 커피군 63.19 ± 13.09 nmol H₂O₂ reduced/mg protein/min, 당뇨군에서 대조군 35.31 ± 17.54 nmol H₂O₂ reduced/mg protein/min, 커피군 43.50 ± 2.24 nmol H₂O₂ reduced/mg protein/min으로 유의적인 차이는 없었다.

고 찰

본 연구에서는 streptozotocin 유발 당뇨 쥐에게 0.5% 커피첨가식을 4주간 섭취시켜 혈당, 혈중 지질 농도, 간 지질함량 및 간의 항산화효소 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 당뇨병에서 체중증가는 당뇨병 치료기간동안 항 당뇨병 제제의 사용과 관련된 중요한 위험 인자로 알려져 있다.¹⁹ 커피는 열 발생, 지질 대사, 또는 지방 분해에 의해 당뇨병 환자에서 체중 감소가 발생한다.²⁰ 수컷 쥐를 대상으로 한 선행연구에서 커피섭취는 현저한 체중감소 유도가 확인되었고,²¹ 반면, 수컷 쥐에게 3%, 6% 커피추출 음료에 0.04%, 0.08% 함유 카페인 식이로 약 80일간 공급한 결과, 체중증가량과 평균 식이섭취량이 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 없었다.²² 이는 장기적인 커피와 카페인 섭취로도 정상적인 식이섭취량과 체중에 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다. 본 연구에서 커피 섭취가 당뇨 쥐의 체중과 식이 섭취량에 미치는 영향을 보면, 실험종료 시 체중은 당뇨군내에서 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았으나 실험기간동안 당뇨 쥐의 체중증가량은 커피 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다. 평균 식이섭취량은 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았으나 식이효율은 커피 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다. 실험종료 시 체중은

당뇨군내에서 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았는데 본 연구의 커피첨가 수준과 유사한 0.6%를 공급한 선행연구¹¹에서도 실험동물의 체중이 대조군보다 높은 것으로 나타나 본 연구결과와 일치하였다. 그러나 4배 높은 수준인 2.4% 커피첨가식은 오히려 체중을 감소시켰는데 이는 커피섭취량이 높은 경우 체중 감소에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 커피는 섭취량에 따라 체중증가에 미치는 영향이 다른 것으로 나타나 실험동물의 연령, 질환유무 등 생리적 상태와 식이에 첨가된 커피 섭취량에 따라 체중증가량 및 식이섭취량을 고려한 식이효율에 미치는 영향이 다를 수 있는 것으로 보여진다.

커피첨가식이 당뇨 쥐의 혈당에 미치는 영향에서 당뇨군의 혈당이 비당뇨군보다 유의적으로 높았고 당뇨군과 정상군 모두 커피군이 대조군보다 혈당이 유의적으로 낮아 커피의 섭취가 당뇨 쥐의 혈당을 낮추는 것으로 나타났다. 이는 커피 5잔 이상 섭취 시 혈당이 유의적으로 감소한다는 연구 결과와,¹⁰ 하루에 커피 1~3잔을 섭취한 경우보다 6잔 이상을 섭취하였을 경우 혈당이 감소한다는 보고²³와 같은 결과를 나타내었다. 여러 선행연구에서 커피의 섭취가 혈당을 감소시키고 당뇨병 위험인자를 감소시키는 것으로 보고되었는데, 이는 커피에 존재하는 페놀성 화합물이 궁극적으로 혈장 글루코스 수준의 감소를 유도하도록 간에서 글루코시다아제, GLUT4, 글루코스-6-포스파타제의 작용 방지, 장내 글루코스 흡수 억제, 인슐린 저항성 감소, 공복 시 혈장 포도당 농도 감소, 말초 조직에서 인슐린 감수성을 증가시킴으로써 포도당대사에서 카페인의 부정적인 영향에 길항적으로 작용하기 때문으로 보여진다.²⁴

본 연구에서 제공한 실험식이의 커피 첨가수준은 기본 식이의 0.5%로 공급하였으며 당뇨 쥐의 1일 평균 식이섭취량은 35.8 g으로 이중 카페인 섭취량은 체중 kg 당 27.20 mg이었다. 실험동물의 경우 이 정도 카페인 섭취수준을 사람에게 적용하기 위하여 동물의 섭취 용량을 체표면적 (body surface area, BSA)에 근거한 사람의 섭취 용량 (human equivalent dose, HED)으로 전환²⁵하여 산출해보면, 이는 체중 70 kg의 당뇨병 성인 남자가 하루에 308.7 mg의 카페인을 섭취하는 수준에 해당되는 양이다. 커피 한 잔에 약 60~80 mg정도의 카페인이 함유되어 있으므로⁴ 커피로 하루에 3.9~5.1잔 정도 섭취하는 수준에 해당된다. 또한 비당뇨쥐의 평균 식이섭취량은 22.9 g/day로 이중 카페인 섭취량은 체중 kg 당 11.23 mg이었고, 이는 체중 70 kg의 정상 성인 남자가 하루에 127.4 mg의 카페인을 섭취하는 양이며, 커피로는 1.6~2.1잔 정도 섭취하는 수준에 해당되는 양이다. 본 연구에서 당뇨 쥐에게 0.5% 커피 첨가식을 공급한 결과, 커피군의 혈당은 대조군보다 23.9% 유

의적으로 감소하였고 비당뇨군에서도 커피군의 혈당이 대조군보다 21.1% 유의적으로 감소하여 4주간의 커피의 섭취가 당뇨군과 비당뇨군 모두에서 유의적인 혈당 감소 효과가 나타났다. 본 연구에서 사용한 커피는 일반적인 인스턴트커피에 클로로젠산이 강화되어 있는 커피가루를 사용하였으며, 실험동물은 체중 kg당 평균 50 mg의 클로로젠산을 섭취하여 클로로젠산의 항산화활성으로 인해 혈당 저하에 영향을 미쳤으리라 보여진다.

커피 섭취에 따른 혈중 지질에 미치는 영향을 보고한 선행연구를 살펴보면, 40% 고지방식이에 커피 0.6 (5잔), 1.2 (10잔), 2.4% (20잔) 수준으로 공급한 결과, 혈중 중성지방 농도가 0.6% 커피섭취군은 유의적으로 증가하였고 1.2%와 2.4% 커피섭취군은 혈중 중성지방농도가 대조군과 같은 수준을 유지하였고, 총콜레스테롤 농도는 커피섭취군이 대조군보다 유의적으로 높았으며 HDL-콜레스테롤 농도는 커피섭취군 모두 대조군보다 유의적으로 높게 나타났다.¹¹ 선행연구²⁶에 의하면 커피를 28일간 섭취시켰을 때 LDL-콜레스테롤 농도는 증가하였다고 보고하였으며, 1,017명을 대상으로 한 메타분석에서 평균 45일간 커피를 마시는 경우 총 콜레스테롤 8.1mg/dL, LDL-콜레스테롤 5.4 mg/dL, 중성지방 12.6mg/dL 유의적으로 증가하는 것으로 나타났고, 카페인이 함유된 커피를 섭취하는 경우 총 콜레스테롤 증가가 더 많았으며, 특히 고지혈증인 대상자는 커피에 의한 콜레스테롤 증가 효과에 더 민감한 것으로 나타났다.⁸

반면, 수컷 쥐를 대상으로 140일간 0.62% 커피 식이와 1.36% 커피 식이를 공급한 결과, 커피섭취 여부에 따른 혈중 콜레스테롤 농도는 유의적인 차이가 없었다고 하였다.²⁷ 적당한 커피 섭취는 심혈관계 질환의 위험을 감소시킨다고 보고한 연구에서²⁸ 사람을 대상으로 한 연구들은 대부분 커피 등의 음료 형태로 섭취하고 있어 커피를 통한 카페인의 섭취 형태가 정제된 카페인의 형태로 섭취하는 것이 아니므로 커피의 카페인 영향이커피보다 커피에 함유된 항산화 물질의 영향 때문으로 추정하고 있다.

카페인 최대일일섭취권고량인 400 mg/day²⁹를 평균 60~70 kg의 성인의 체중 1 kg당으로 환산하면 5.7~6.6 mg/kg 체중이므로 한국 성인 카페인 최대일일섭취권고량인 약 6 mg/kg 체중으로 본 실험식에서 공급한 커피 중에 함유된 카페인 양으로 환산²⁵하면 4.41 mg/kg 체중으로 안전한 수준에 해당하는 양이다. 따라서 4주간 0.5% 커피 첨가식의 섭취는 당뇨 쥐에서 1일 카페인 섭취량으로 체중 kg 당 27.20 mg이므로 이 수준의 카페인을 함유하고 있는 커피의 규칙적인 섭취는 영양소 섭취가 알맞은 경우 당질대사의 이상인 상태에서도 혈중 지질에 유해한 영향을 미치

지 않는 것으로 나타났다. 이는 당뇨병 쥐에서 커피를 4주간 섭취시킨 경우 적용된 효과인지 영양소의 섭취가 알맞은 경우 효과가 나타나지 않은 것인지 추후 연구가 요망된다. 또한 선행 연구에서 카페인의 여러 가지 효과들이 섭취 수일 이후에 나타날 수 있는 부분적인 내성 때문인 경우 일시적일 수 있음이 지적된 바 있고,³⁰ 이러한 효과는 섭취 수준과 섭취 기간 및 다른 영양소의 섭취 상태에 따라 달라질 수 있으므로 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

당뇨 쥐에게 카페인이 함유된 혼합물을 보충한 차를 공급하였을 때 지방조직의 함량, 간의 중성지방 함량이 대조군보다 유의적으로 낮아서 지방 대사를 개선하는 것으로 나타났고, 카페인을 마우스에게 섭취시켰을 때 간의 MDA 수준이 유의적인 증가를 보였으나³¹ 본 연구에서는 커피첨가 식이 섭취에 따른 간 과산화지질 MDA 함량에 미치는 영향이 비당뇨군내에서 커피군이 대조군보다 유의적으로 낮았고 당뇨병군내에서는 커피섭취에 따른 차이가 없었다.

커피첨가식이 간조직 항산화효소인 SOD, GPx 및 CAT 활성에 미치는 영향을 분석한 결과에서는 비당뇨군과 당뇨병군 모두에서 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 커피나 카페인의 섭취가 항산화효소 활성에 미치는 영향을 보고한 선행연구를 살펴보면, Rossow 등³²은 카페인을 쥐에게 섭취시켰을 때, 심장의 SOD 활성이 증가하였으나 GPx의 활성은 카페인의 영향을 받지 않았다고 하였으며, Kim과 Chung은³³ 1%와 4% 수준으로 커피첨가식을 공급하였을 때 커피 섭취 수준이 증가할수록 SOD 활성은 증가하였다고 보고하였다. 또한 수컷 쥐에게 3%, 6% 커피 추출음료에 0.04%, 0.08% 함유 카페인이 식이로 약 80일간 공급하였을 때 이는 카페인으로 약 20~40 mg/kg/day에 해당하는 양으로 장기적인 커피와 카페인의 섭취가 뇌 조직에서 GPx 활성에는 영향이 없었으나 glutathione reductase와 SOD 효소의 활성도가 증가하였고 뇌세포막의 지질과산화도가 감소되어 장기적인 커피의 섭취가 뇌의 내인성 항산화체계를 조절하는 것으로 나타났다.²² 평균체중 200 g 수컷 쥐에게 물 리터 (liter)당 80 g 원두커피를 추출하여 강제 급여 (gavage 튜브 피딩)로 2 mL 투여한 결과, 간 조직의 SOD, GPx 및 CAT 활성도가 대조군보다 유의적으로 증가하여 지질과산화도가 감소된다고 보고하였다.³⁴ 반면에 실험동물을 대상으로 커피박 0.5%와 1.0% 두 수준으로 공급한 선행연구에서 소장 및 간 조직에서는 항산화 방어작용에 관여하는 SOD, GPx 및 glutathione S-transferase (GST) 활성도는 차이가 없었지만 간 조직에서 지질과산화도를 나타내는 지표인 MDA 수준은 커피박 급여군에서 감소되는 것으로 나타나³⁵ 본 연구결과와 유사한

경향을 보고하였다. 이상의 여러 선행연구 결과에서 순수 카페인 또는 커피 섭취 형태에 따른 생체 조직별 항산화효소 활성에 미치는 효과는 상이하였다.

산화스트레스를 감소시키기 위해 권장되는 식품과 영양 보충제로 섭취되는 항산화성분의 섭취는 산화스트레스를 감소시킨다. 커피는 chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine, melanoidins, hydroxycinnamic acids 같은 항산화성분이 풍부하여 커피를 급성 혹은 만성적으로 섭취하는 경우 혈중 항산화능을 증가시키며,³⁶ 제2형 당뇨병에서 생성되는 산화적 스트레스는 장기적인 커피의 섭취로 방지할 수 있는 것으로 나타나 장기적인 커피 소비로 인한 항산화 활성 증가로 당뇨병 위험이 감소되는 것으로 확인되었다.³⁷

본 연구결과로 보아 식이의 0.5% 커피첨가식은 당뇨병 쥐의 항산화효소 활성도에는 영향을 미치지 않았지만, 커피에 함유된 항산화물질인 클로로젠산의 영향으로 체조직에서 항산화능을 증진시켜⁵ 간 조직의 지질과산화를 방지하는데 작용한 것으로 사료된다. 본 연구에서는 실험군 간에 항산화활성에 유의적인 차이가 나타나지 않았는데, 이는 선행연구^{22,33}에 비해 적은 양의 커피를 첨가하였기 때문으로 보여지며, 이는 생리적 상태가 다른 경우 커피섭취량에 따른 영향이 다를 수 있음을 나타낸 것이다. 또한 당뇨병과 같은 병리상태에서는 정상상태보다 식이로 공급되는 생리활성물질의 영향이 미약할 수 있고 식이섭취의 효과는 내인성체계의 기간에 따른 적용 효과가 작용했을 것으로 보여진다. 따라서 장기적인 커피섭취에 따른 부작용이 없으면서 항산화활성에 영향을 미치는 유효한 커피 첨가수준에 대한 추후연구가 필요하겠다.

요 약

커피첨가식을 섭취한 당뇨병 쥐에서 혈당, 혈중 지질농도, 간지질함량 및 간조직의 항산화효소인 SOD, GPx, CAT에 미치는 영향을 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다. 실험시작 시 체중은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었고 실험종료 시 체중은 당뇨병군내에서 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았으며, 실험기간동안 체중증가량은 당뇨병군이 비당뇨군보다 유의적으로 낮았으나 커피첨가식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 평균 식이섭취량은 당뇨병군이 비당뇨군보다 유의적으로 높았고, 당뇨병군내에서는 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았으며, 식이효율은 당뇨병군이 비당뇨군보다 유의적으로 낮았으나 커피 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 당뇨병군과 비당뇨군 모두 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 커피군이 대조군보다 유의적으로 높았고, LDL-콜레스테롤 농도와 atherogenic

index는 커피군이 대조군보다 유의적으로 낮았다. 간의 중성지방 함량은 당뇨군과 비당뇨군 모두 커피군이 유의적으로 낮았고, 총콜레스테롤 함량은 커피섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다. 간 조직의 MDA 함량은 당뇨군과 비당뇨군 모두 커피군이 대조군보다 유의적으로 낮았다. 간 조직의 항산화효소인 SOD, GPx, CAT 활성은 당뇨군과 비당뇨군 모두 커피섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 혈당은 당뇨군과 비당뇨군 모두 커피군이 대조군보다 유의적으로 낮았다.

결론적으로 당뇨 쥐에서 0.5% 커피첨가식이 간의 항산화효소 활성에는 유의적인 영향이 없었으나, 당뇨 쥐의 혈당을 낮추었고, 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 높였으며, 혈중 LDL-콜레스테롤 농도, atherogenic index, 간 중성지방 함량 및 과산화지질 MDA는 낮추어 혈당과 혈중 및 간 지질 개선에 도움이 되는 것으로 나타났다.

References

1. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea Health Statistics 2013: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-1). Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2014.
2. Akash MS, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 2013; 114(3): 525-531.
3. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(5): 339-352.
4. Borrelli RC, Visconti A, Mennella C, Anese M, Fogliano V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem* 2002; 50(22): 6527-6533.
5. Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Braz J Plant Physiol* 2006; 18(1): 23-36.
6. van Dam RM, Feskens EJ. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2002; 360(9344): 1477-1478.
7. van Dam RM, Hu FB. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA* 2005; 294(1): 97-104.
8. Cai L, Ma D, Zhang Y, Liu Z, Wang P. The effect of coffee consumption on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(8): 872-877.
9. Driessen MT, Koppes LL, Veldhuis L, Samoocha D, Twisk JW. Coffee consumption is not related to the metabolic syndrome at the age of 36 years: the Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63(4): 536-542.
10. van Dam RM, Dekker JM, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, Heine RJ; Hoorn study. Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetologia* 2004; 47(12): 2152-2159.
11. Kang KJ, Choi SS, Han HK, Kim KJ, Kwon SY. Effects of instant coffee on weight, plasma lipids, leptin and fat cell size in rats fed on a high fat diet. *Korean J Food Sci Technol* 2004; 36(3): 478-483.
12. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11): 1939-1951.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509.
15. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, Gawehn K, editors. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edition. New York (NY): Academic Press; 1974. p.673-684.
16. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-169.
17. Martin JP Jr, Dailey M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 1987; 255(2): 329-336.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
19. Akash MS, Rehman K, Chen S. An overview of valuable scientific models for diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2013; 9(4): 286-293.
20. Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A. Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(4): 682-693.
21. Muroyama K, Murosaki S, Yamamoto Y, Odaka H, Chung HC, Miyoshi M. Anti-obesity effects of a mixture of thiamin, arginine, caffeine, and citric acid in non-insulin dependent diabetic KK mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003; 49(1): 56-63.
22. Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MF, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 99(4): 659-664.
23. Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, Hu FB. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 140(1): 1-8.
24. Loopstra-Masters RC, Liese AD, Haffner SM, Wagenknecht LE, Hanley AJ. Associations between the intake of caffeinated and decaffeinated coffee and measures of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia* 2011; 54(2): 320-328.
25. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22(3): 659-661.
26. Onuegbu AJ, Agbedana EO. The effects of coffee consumption on serum lipids and lipoprotein in healthy individuals. *Afr J Med Med Sci* 2001; 30(1-2): 43-45.
27. Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Takahashi K, Nakao K, Izumi H. Relationship of coffee consumption with risk factors of atherosclerosis in rats. *Ann Nutr Metab* 2005; 49(3): 149-154.
28. Cornelis MC, El-Sohemy A. Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(6): 745-751.
29. Ministry of Food and Drug Safety (KR). [Internet]. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety; 2008 [cited 2015 Feb 2]. Available from: <http://www.mfds.go.kr>.

30. Lovallo WR, Wilson MF, Vincent AS, Sung BH, McKey BS, Whitsett TL. Blood pressure response to caffeine shows incomplete tolerance after short-term regular consumption. *Hypertension* 2004; 43(4): 760-765.
31. Sung JH, Chang CC, Chang YS. The effect of caffeine on the antioxidative activities of mouse liver. *Korean J Food Nutr* 2004; 17(4): 442-449.
32. Rossowska MJ, Ghanaei P, Nakamoto T. Effect of dietary caffeine and zinc on the activity of antioxidant enzymes, zinc, and copper concentration of the heart and liver in fast-growing rats. *Biol Trace Elem Res* 1995; 50(3): 229-236.
33. Kim HY, Chung HS. Effect of dietary iron and coffee intake on oxidative stress and antioxidative enzyme activities of rats. *Korean J Nutr* 2002; 35(9): 919-925.
34. Vicente SJ, Ishimoto EY, Cruz RJ, Pereira CD, Torres EA. Increase of the activity of phase II antioxidant enzymes in rats after a single dose of coffee. *J Agric Food Chem* 2011; 59(20): 10887-10892.
35. Ko YH, Kang SY, Jang IS. Effects of dietary supplementation of coffee meal on growth performance, blood biochemical profiles and antioxidant defense system in broiler chickens. *Korea J Poult Sci* 2012; 39(3): 223-232.
36. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69(1): 70-74.
37. Natella F, Nardini M, Beelli F, Scaccini C. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(3): 604-609.