

당뇨쥐의 간 Microsome에서 Phospholipase A₂ 활성과 지질과산화

이순재[†] · 최정화

대구효성기톨릭대학교 식품영양학과

Phospholipase A₂ Activity and Lipid Peroxidation in Liver Microsome of Streptozotocin Induced Diabetic Rats

Soon-Jae Rhee[†] and Jeong-Hwa Choi

Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu 712-702, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate phospholipase A₂ activity and lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats weighting 300±10gm were randomly assigned to normal and STZ-induced diabetic group. Diabetes was induced by intravenous injection of 55mg/kg of STZ in sodium citrate buffer(pH 4.3). Animals were sacrificed at the 6th day of diabetic states. Body weight gains were lower in DM group. Phosphatidylcholine hydrolysis in liver was not significantly different between two groups, whereas phosphatidylethanolamine hydrolysis in liver was increased by 69% in DM group comparing with that of normal group. Liver microsomal phospholipase A₂ activity and level of TBARS was increased by 91%, 109% in DM group compared with that of normal group, respectively. The present results indicate that phospholipase A₂ activity is specific to PE hydrolysis, leading to lipid peroxidation process in STZ induced diabetic rats.

Key words: diabetes, phospholipase A₂, lipid peroxidation

서 론

생체막 지질에서 free radical 반응의 결과로 지질과산화물이 생성되는데 이 free radical의 발생기전으로는 두가지 측면을 들 수 있다. 그 하나의 기전으로 NADPH oxidase계에 의한 O₂⁻와 H₂O₂ 발생이며(1), 또 다른 기전으로는 phospholipase A₂ 활성의 증가로 유리 arachidonic acid 조성이 높아짐으로써(2-4) lipoxygenase와 cyclooxygenase 활성이 증가되어 endoperoxide가 생성되고 이의 대사과정에서 free radical이 생성되므로써 지질과산화가 일어난다고 알려져 있다(4-6).

이러한 측면에서 생체 조직의 과산화지질 생성의 대사기전을 이해하려는 하나의 시도으로써 생체막의 과산화 반응의 표적이 되는 인지질을 분해하는 효소인 phospholipase와의 상관관계에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 인지질 분해효소는 위치 특이성에 따라 지방산의 ester 결합을 가수분해하는 phospholipase A₁(PLA₁), phospholipase A₂(PLA₂)와 phosphoester 결합을 가수분해하는 효소인 phospholipase C(PLC), phospholipase D(PLD)로 나누어 진다. 세포가 어떤 자극을 받았을 때 인지질 분해효소인 phospholipase가 활성화되어 arachidonic acid가 유리되는데 이 반응에 관여하는 주된 효소는 PLA₂와 PLC이지만 인지질에 직접적으로 관여하여 arachidonic acid를 유리시키는 효소는 PLA₂로 알려져 있다(2)

PLA₂는 glycerol-3-phospholipid의 sn-2 위치의 fatty acid ester 결합을 가수분해하여 유리지방산과 lysophospholipid를 생성함이 보고되었다(5,6). 대개 인지질의 2번째 위치에는 고도의 불포화지방산만이 ester 결합을 하고 있으므로 free radical의 공격을 받아 과산화물이 생성된다(7). 이렇게 생성된 분해산물 중 유리지방산은 염증 부위에서 혈관 투과성 증가, 혈관 확장작용 등을 나타내며(8), lysophospholipid는 용혈작용 및 혈소판 응집작용(9) 등의 생리활성을 나타낸다. 또한 PLA₂에 의해 인지질로부터 유리된 arachidonic acid인 경우는 eicosanoid 생성을 위한 전구체를 제공하거나 인지질의 1번

[†]To whom all correspondence should be addressed

위치에서 acyl ether linkage가 포함되어 있는 경우 혈소판 활성화 인자 형성을 위한 전구체를 제공할 수 있다. 이는 Edward의 보고(10)가 있다.

이렇게 arachidonic acid cascade의 율속효소로 알려진 PLA₂는 CCl₄와 같은 외부의 여러가지 stress나 내적인 병리상태에 따라 활성화되어 지질과산화를 촉진시킨다고 보고되고 있다(11,12).

이러한 견지에서 본 연구에서는 당뇨쥐 간조직에서의 PLA₂ 활성변화에 따른 인지질의 분자종의 변화와 그에 따른 지질과산화물의 생성과의 관련 양상을 관찰하고자 본 실험을 행하였다

재료 및 방법

실험재료

당뇨유발용으로 사용한 streptozotocin(STZ)은 Sigma사(St Louis, USA) 제품을 사용하였다. TLC plate는 Merck사, thiobarbituric acid(TBA) 및 albumin(bovin serum albumin)은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그외 모든 분석시약은 특급을 사용하였다.

실험동물의 사육

실험동물은 체중 70g 내외의 Sprague-Dawley종 숫컷을 Table 1과 같은 일반사료로 6주간 사육한 후에 난괴법(completely randomized block design)에 의해 당뇨를 유발하지 않는 정상군과 당뇨유발 실험군으로 나누는 후 실험동물은 희생하기 6일전에 STZ를 55mg/kg body weight를 멸균여과한 citrate buffer(pH 4.3)에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. STZ을 주사한 후 6일째 혈당량이 300mg/dl 이상인 동물만 실험에 사용하였다.

체중증가, 식이섭취량 및 식이효율

체중은 전 실험기간을 통하여 이틀에 한번씩 일정한 시간에 측정하였으며 식이효율은 전 체중증가량을 같은 기간 동안의 식이섭취량을 나누어 줌으로써 계산하였다.

생화학적 분석

시료조제 : Microsome 분리

간장조직의 microsome 분획은 0.25M sucrose로 간조직을 균질화시킨 후 8000×g에서 4분간 원심분리하였다. 이때 얻어진 상층액을 다시 105,000×g에서 원심

Table 1. Composition of basal diet

Ingredients	Basal diet(g/kg diet)
Corn starch ¹⁾	668
Casein ²⁾	180
DL-methionine ³⁾	2
Corn oil ⁴⁾	50
Vitamin mix ⁵⁾	10
Salt mix ⁶⁾	40
Cellulose ⁷⁾	50
<hr/>	
kcal/kg	3850

¹⁾Pung jin Chem Co.

²⁾Lactic casen, 30 mesh, New Zealand Dary Board. Wellington, N.Z.

³⁾Sigma Chem. Co.

⁴⁾Dong Bang Oil Co.

⁵⁾Vitamin mix According to NRC(13)

per kg of diet. thiamin-HCl, 20mg, riboflavin, 21mg, pyridoxine, 20mg; nicotinic acid, 90mg; d-calcium pantothenate, 60mg; folic acid, 10mg, biotin, 1mg, menadione, 45 mg, vitamin B₁₂(0.1% triturate in mannitol), 20mg; retinyl acetate, 2,000IU; cholecalciferol, 1,000IU, choline, 1.5 g; inositol, 0.1g; vitamin C, 0.9g; p-amino benzoic acid, 0.1g; dl-α-tochopherylacetate, 40mg

⁶⁾Salt mix: according to Haper's(13)

per 100g of salt mixture: CaCO₃, 30.0g, CaHPO₄, 7.5g; K₂HPO₄, 32.2g; NaCl, 16.7g, MgSO₄ · 7H₂O, 10.2g, ferric-trate, 2.75g; MnSO₄, 0.51g, KI, 70mg, CuCl₂ · 5H₂O, 35mg, ZnCl₂, 25mg; CoCl₂ · 5H₂O, 5mg; (NH₄)₂MoO₇ · 4H₂O, 5mg

⁷⁾Sigma Chem Co.

CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

분리하여 microsome 분획을 얻어서 한번더 105,000×g에서 원심분리한 후 0.25M sucrose로 부유시킨 후 실험에 사용하였다.

인지질 분자종 분리 및 측정

① 지질 추출법(14)

간 microsome을 5mg protein/ml로 희석한 것을 chloroform : methanol=1 : 1 비율로 넣어 교반한 후 3000 rpm에서 원심분리하였다. 이때 하층액을 취하고, 상층액에 chloroform 2.4ml를 넣어 교반하여 얻은 하층액을 합하여 N₂ gas로 날린 후 lipid film을 형성하였다.

② 인의 정량법

Marinetti방법(15)으로 lipid film에 200μl chloroform를 넣은 후 20μl를 취하였으며, 3mM KH₂PO₄를 표준으로 하고 60% HClO₄ : c-H₂SO₄=1 : 1를 넣어 분해시켰다. 여기에 ammoniummolybdate, reducing reagent[NH₂-C₁₀H₅(OH)-SO₃H 0.25g과 Na₂SO₄ 1g을 유발에서 혼화시킨 후 15% NaHSO₃ 100ml와 섞은 후 filter]를 넣어 95°C에서 10분간 heating시킨 후 다시 실내온도에서 식힌 후 750nm에서 흡광도를 측정한다.

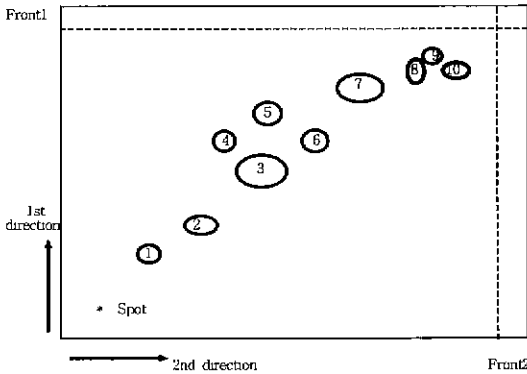


Fig. 1. Thin layer chromatogram of various kinds of phospholipid.

1: Lysophosphatidylcholine, 2: Sphingomyelins, 3: Phosphatidylcholine, 4: Lysophosphatidylethanolamine, 5: Phosphatidylinositol, 6: Phosphatidylserine, 7: Phosphatidylethanolamine, 8: Phosphatidic acid, 9: Cardiolipin, 10: Unknown

③ Phospholipid 분자종의 분리

Phospholipid의 분리는 2차원 TLC로 분리하였으며, 1차 전개용매로는 chloroform : methanol : acetic acid = 65 : 25 : 10을 사용하였고, 2차 전개용매로는 chloroform : methanol : formic acid(88%) = 65 : 25 : 10을 사용하였다.

TLC plate는 MERCK사의 5721번(20cm×20cm, silicagel 60, without fluorescent indicator)을 사용하였고 I₂로 발색시킨 후 다시 ninhydrin으로 발색시켰다.

인지질 분자종 위치는 Fig. 1과 같으며 PC, LysoPC, PE, LysoPE를 상기와 같은 방법(15)으로 인정량하여 phosphatidylcholine hydrolysis와 phosphatidyl-ethanolamine hydrolysis를 구하였다.

Phospholipase A₂ 활성 측정

기질로는 1-pal-2-[1-¹⁴C] linoleoyl PE를 사용하였

고 유리되어진 linoleic acid를 측정하는 Dole과 Meinertz 방법(16)을 사용하였다.

즉, 효소로는 1mg protein/ml로 희석한 microsome을 사용하였으며 기질로는 1-pal-2-[1-¹⁴C] linoleoyl PE(1000cpm/nmol) 20nmol을 37°C에서 20분간 배양시켰다. 여기에 Dole시약과 증류수를 넣고 교반한 후 3000 rpm에서 원심분리하여 얻어진 상층액을 heptane에 넣는다 다시 교반한 후 원심분리하여 얻어진 상층액을 toluene계 cocktail solution에 넣은 후 liquid scintillation counter에서 유리되어진 linoleic acid를 측정한다.

지질과산화물 함량 측정

과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 물질을 n-butanol로 추출하는 Satoh방법(17)을 이용하였다

단백질 측정

간조직 microsome의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등의 방법(18)에 의해 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석을 수행하였으며, 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test(19)에 의해 분석하였다.

결 과

체중증가, 식이섭취량 및 식이효율

실험 4주간 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 실험기간 동안 체중변화를 관찰한 결과 STZ를 투여하기 전까지는 정상군과

Table 2. Body weight gains, food intakes, and food efficiency ratios of rats

Groups	Body weight gain (g/4wks)	Food intake (g/4wks)	FER	Liver weight (g/100g B.W.)
Before STZ injection				
Normal	200.0±26.06 ^{NS}	351.3±50.88 ^{NS}	0.58±0.02 ^{NS}	
DM	245.0±12.25	443.2±18.30	0.55±0.02	
After STZ injection (g/6days)				
Normal	17.5±3.23 ^a	73.1±14.69 ^{NS}	0.25±0.04 ^a	4.13±0.15 ^{NS}
DM	-25.0±7.64 ^b	105.6±26.77	-0.47±0.24 ^b	3.64±0.31

All values are mean±SE(n=10)

Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

^{NS}Not significant

FER: Food Efficiency Ratio

당뇨군간의 유의적인 차이는 없었으나 STZ를 투여한 후에는 당뇨군은 정상군에 비해 체중이 감소하였다.

식이섭취량은 STZ 투여 당뇨군에서 다소 높았으나 유의적인 차이가 없었으며, 식이효율은 STZ 투여 후에는 당뇨군은 감소하였다. 체중 100g당 간장의 무게는 정상군에 비해 당뇨군은 약간 낮았다.

인지질 분자종의 변화

Incubation time에 따른 인지질 분자종의 변화

Microsomal fraction에서 incubation time별로 추출한 lipid를 2차원 TLC로 분리한 후 인정량하여 구한 PC hydrolysis, PE hydrolysis 값은 Fig. 2, Fig. 3에서 보는 바와 같다. 0, 30, 60분간 incubation한 결과 시간이 경과함에 따라 PC hydrolysis, PE hydrolysis가 증가하

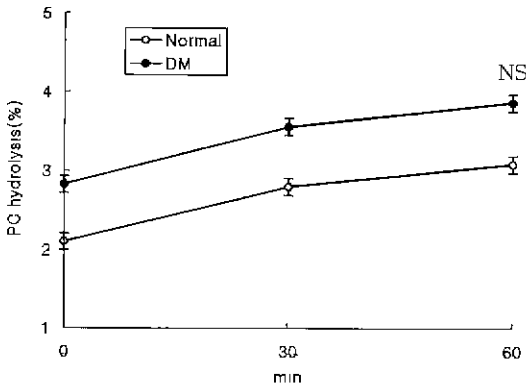


Fig. 2. Changes of PC hydrolysis during incubation. All values are mean±SE(n=10) Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

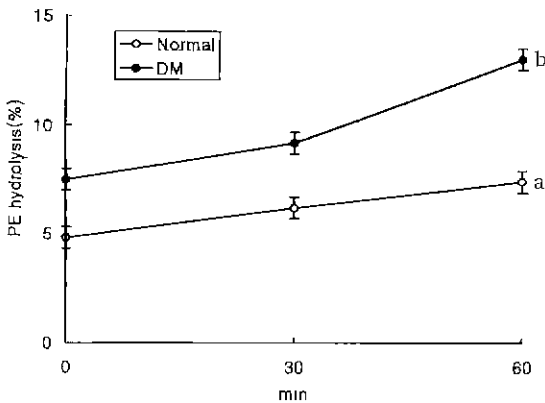


Fig. 3. Changes of PE hydrolysis during incubation. All values are mean±SE(n=10) Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

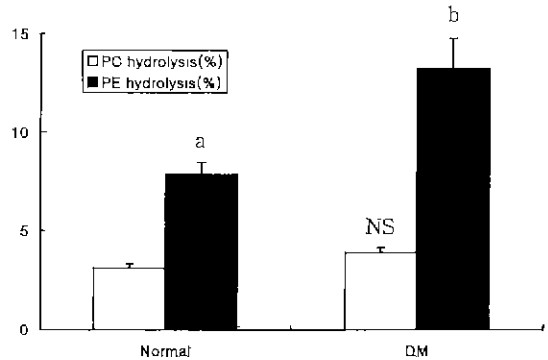


Fig. 4. Phosphatidylcholine hydrolysis and phosphatidylethanolamine hydrolysis in liver microsome of streptozotocin-induced diabetic rats.

여 60분에서는 0분때보다 각각 1.5배 정도 증가하였다. 따라서 본 실험에서는 60분간 incubation하여 실험을 행하였다

PC hydrolysis 및 PE hydrolysis

Microsomal fraction에서 60분간 incubation한 lipid를 2차원 TLC로 분리하여 구한 PC hydrolysis와 PE hydrolysis값은 Fig. 4와 같다.

PC hydrolysis는 2차원 TLC로 분리하여 PC와 lysoPC의 spot를 끊어 인을 정량하여 얻은 PC 가수분해되는 정도이며 정상군과 당뇨군간의 유의적인 차이는 없었다.

또한, PE와 lysoPE의 spot를 끊어 인정량하여 PE hydrolysis를 알아본 결과, 정상군에 비해 당뇨군은 68.9% 증가하였다.

PLA₂ 활성 변화 및 지질과산화물 수준

간조직 중의 PLA₂ 활성을 알아본 결과 정상군에 비해 당뇨군은 90.96% 높았다. 이러한 PLA₂ 활성 변화는 PE hydrolysis의 값과 비슷한 양상을 나타냄으로써 P-PLA₂는 PE hydrolysis에 특이적으로 작용함을 알 수 있었다.

생체조직의 과산화적 손상의 지표로 알려진 지질과산화물을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 정상군에 비해 당뇨군은 약 2배 높았다. 이러한 결과는 PLA₂ 활성 변화와 비슷한 양상으로서 지질과산화물의 측정이 변화됨을 알 수 있다.

고 찰

본 연구는 STZ에 의해 유발된 당뇨쥐의 간조직에 있어서 PLA₂ 활성 및 인지질 분자종 변화에 따른 지질과

Table 3. Phospholipase A₂ activity and thiobarbituric acid reactive substance in liver of streptozotocin-induced diabetic rats

Groups	PLA ₂ (dpm/mg protein)	TBARS (MDAnmol/mg protein)
Normal	430.5±27.5 ^a	1.85±0.16 ^a
DM	822.3±29.6 ^b	3.88±0.13 ^b

All values are mean±SE(n=10)

Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

산화물의 생성 정도를 관찰하고자 시도하였다. 본 실험에서 체중 증가량을 관찰한 결과 정상군은 전 실험기간 동안 계속적인 증가를 보인 반면 STZ 유발 당뇨군은 STZ를 주사한 후 현저하게 체중감소를 보였는데 이는 박(20)과 Lau와 Faiilla(21)에서 보고된 것과 같은 결과였다.

식이섭취량이 있어서 STZ 유발 전후 모두 작군간의 차이는 없었다. 식이효율은 STZ 유발 전에는 정상군과 당뇨군간의 유의적인 차이는 없었으나 STZ 유발 후에는 당뇨유발군은 감소되었고 이는 STZ 유발 당뇨군에서 식이효율이 감소한다는 최의 보고(22)와도 유사하였다. 이의 보고(23)에서도 정상군에 비해 당뇨군이 식이효율이 낮아졌으며 이는 당뇨시에 심한 체중감소 때 문이라고 한다.

인지질 분해효소인 phospholipase 중 PLA₂는 과산화지질을 형성하기 쉬운 인지질의 2번 위치의 ester결합을 가수분해하여 free fatty acid와 lysophospholipid를 생성하는 효소(5,6)이다. 또한 Stephen 등의 보고(7)에서 membrane이 free radical generating system에 노출되면 내인성 lysophospholipid의 수준이 증가한다고 한다. 따라서 lysophospholipid의 축적을 알아봄으로서 phospholipase의 활성 정도를 알 수 있으므로 PE 가수분해 정도와 microsomal phospholipid의 50~53%를 차지하고 있는 PC의 가수분해 정도를 인지질 분자종의 변화로서 알아보았다.

그 결과 PC hydrolysis는 정상군과 당뇨군간의 유의적인 차이가 없었으나, PE hydrolysis는 정상군에 비해 당뇨군은 68.98% 증가하였다. 이는 CCl₄로 간손상을 준 군과 정상군을 비교하였을 때 PC hydrolysis는 작군간의 유의적인 차이는 없었고 PE hydrolysis는 정상군에 비해 CCl₄ 처리한 군이 2배정도 증가한 황의 보고(12)와 일치하였다. 이러한 PE hydrolysis의 증가는 phospholipase가 PE에 특이적으로 작용한 결과로 생각되어진다.

세포내에서 유리상태로 존재하지 않고 생체막 인지

질의 2번 위치에 ester형으로 결합되어 있는 arachidonic acid의 cascade에는 PLA₂가 유효효소로서 작용함이 알려져 있으며 arachidonic acid는 대사되어 지질과 산화를 촉진시키게 된다. 따라서 인지질 분자종 변화로서 phospholipase의 역할을 알았고 이중 PLA₂의 활성을 알기 위하여 외부적 기질의 사용으로 알아본 PLA₂ 활성을 측정한 결과는 정상군에 비해 당뇨군은 90.96% 증가하였다.

이러한 결과는 PE hydrolysis의 경향과 비슷한 것으로서 PE hydrolysis를 발생시키는 효소가 phospholipase 중에서도 PLA₂라는 것을 확인할 수 있다.

체내 과산화적 손상의 지표가 되는 지질과산화값을 관찰한 결과도 정상군에 비해 당뇨군은 109.23% 증가하였다.

이와같이 STZ 유발 당뇨군에서 지질과산화값이 현저하게 되는 것은 Panganamala와 Cornwell(2)의 보고와 같이 생체막 지질에서 PLA₂의 활성의 증가로 arachidonic acid 함량이 증가되고 따라서 lipoxygenase와 cyclooxygenase system이 항진되어 free radical 생성이 증가된 것이 하나의 요인이 된다고 생각된다.

이상의 결과에서 당뇨쥐에서는 PLA₂ 활성증가와 PE hydrolysis에 의존적으로 지질과산화물의 축적이 일어남을 알 수 있다.

요 약

본 실험에 사용된 동물은 체중이 70g±5g 되는 Sprague-Dawley중 흰쥐 수컷을 4주간 사육하여 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 후 6일째에 희생하여 당뇨쥐에 있어서 PLA₂ 활성과 지질과산화 및 인지질 분자종 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다. 1. 체중증가량은 STZ 투여 당뇨군에서 현저하게 감소하였다. 식이섭취량은 STZ를 투여한 후에도 두군간의 유의적인 차이는 없었으나 식이효율은 당뇨군에서 낮았다. 체중 100g당 간조직의 무게는 정상군과 당뇨군에 차이가 없었다. 2. 간조직 중의 PC hydrolysis는 정상군과 당뇨군간의 유의적인 차이가 없었으나 PE hydrolysis는 정상군에 비해 당뇨군이 69% 증가하였다. 3. 간조직의 PLA₂활성은 당뇨군이 정상군에 비해 91% 증가하였다. 4. 간조직의 지질과산화물기는 정상군에 비해 당뇨군은 109% 증가하였다. 이상의 결과로 STZ 유발 당뇨쥐에서 PLA₂의 활성이 증가됨에 따라 지질과산화 반응이 촉진됨을 알 수 있었으며, 또한 PLA₂는 PE hydrolysis에 특이적으로 작용함을 알 수 있었다.

문헌

1. Prichard, K. A., Patel, S. T., Karper, C. W., Newman, H. A. and Panganamala, R. V. : Triglyceride-lowering effects of dietary vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. Increased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes*, **35**, 278(1986)
2. Panganamala, R. V. and Cornwell, D. G. : The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, **393**, 376(1982)
3. Gwebu, E. T., Trewyn, R. W., Cornwell, D. G. and Panganamala, R. V. : Vitamin E and inhibition of platelet lipooxygenase. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **28**, 361(1980)
4. Prichard, K. A., Karpen, C. W., Merda, A. T. and Panganamala, R. V. : Influence of dietary vitamin E on platelet thromboxane A₂ and vascular prostacyclin I₂ in rabbit. *Prost. Leuk. Med.*, **9**, 373(1982)
5. Verheij, H. N., Slotboom, A. J. and Hass, G. H. : Structure and function of phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **91**, 92(1981)
6. Van den Bosch, H. : Intracellular phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Acta*, **604**, 191(1974)
7. Stephen, M., Borowitz and Catherine, M. : The Role of phospholipase A₂ in microsomal lipid peroxidation induced with t-butylhydroperoxide. *Biochem. Biophys.*, **158**, 1021(1989)
8. Lynn, W. S. and Mukherjee, C. : Motility of rabbit alveolar cells : Role of unsaturated fatty acids. *Am. J. Pathol.*, **96**, 663(1979)
9. Gerrard, J. M., Kindom, S. E., Peterson, D. A. and White, J. H. : Lysophosphatidic acids influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux. *Am. J. Pathol.*, **96**, 423(1979)
10. Edward, A. D. : Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13057(1994)
11. 황화신 : 과산화지질의 형성에 있어서 phospholipase A₂의 역할. 영남대학교 석사학위논문(1991)
12. 황귀서 : 당뇨병 랫드의 혈소판 응집능에 미치는 brazilin의 영향 및 그 작용기전에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문(1993)
13. 백태홍, 전세열, 김천호 : 영양학 실험. 수학사(1988)
14. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : The determination of fat extract process. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911(1959)
15. Marinetti, G. V. : Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. *J. Lipid Res.*, **3**, 1(1962)
16. Dole, V. P. and Meinertz, H. J. : Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissue. *Biol. Chem.*, **235**, 2592(1960)
17. Satoh, K. : Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica. Chemica. Acta*, **90**, 37(1978)
18. Lowry, O. H., Rosenbrouth, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
19. 채서일, 김범룡 : SPSS/PC를 이용한 통계 분석. 법문사(1988)
20. 박수영 : 당뇨병발견에서 닭의 장풍의 혈당감소효과와 간조직내의 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 효소활성에 미치는 효과. 생학회지, **25**, 238(1994)
21. Lau, A. L. and Failla, M. L. : Urinary excretion of zinc, copper and iron in the streptozotocin-diabetic rat. *J. Nutr.*, **114**, 224(1984)
22. 최원경 : Streptozotocin 유발 당뇨병에 있어서 항산화적 방어기구 및 metallothionein 합성에 미치는 비타민 E의 영향. 효성여자대학교 박사학위논문(1994)
23. 이연숙 : 등글레 BuOH 추출물의 재분획물이 당뇨병 유발 흰쥐의 혈당수준에 미치는 영향. 덕성여자대학교 석사학위논문(1992)

(1997년 7월 10일 접수)