

간장조직의 활성산소 및 그 제거효소에 미치는 실크 피브로인의 영향

최진호* · 김대익 · 박수현 · 김정민 · 조원기¹ · 이광길² · 여주홍² · 이용우²

부경대학교 식품생명공학부 생화학교실, ¹조아제약(주),
²농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

Effect of Silk Fibroin on Oxygen Radicals and Their Scavenger Enzymes in Liver of SD Rats

Jin-Ho Choi*, Dae-Ik Kim, Soo-Hyun Park, Jung-Min Kim, Weon-Ki Cho¹
Kwang Gill Lee², Joo Hong Yeo² and Yong Woo Lee²

Lab. Biochemistry, Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University
¹Choa Pharmacy Co. Ltd., Seoul Korea
²Dept. of Sericulture & Entomology, National Institute of Agricultural Science & Technology,
RDA, Suwon 441-100, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the effect of silk fibroin (Mw 500) powder (SFP) on oxygen radicals and their scavenger enzymes in liver membranes of rats. Sprague-Dawley (SD) male rats (160±10 g) were fed basic diet (control group), and experimental diets (SFP-2.5 and SFP-5.0 groups) added 2.5 and 5.0 g/kg BW/day for 6 weeks. Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) levels resulted in a considerable decreases (5.8% and 8.4%, 3.7% and 11.1%, respectively) in liver mitochondria and microsomes of SFP-2.5 and SFP-5.0 groups compared with control group, and O_2^- radical level was remarkably decreased about 15% and 20% in liver cytosol of SFP-2.5 and SFP-5.0 groups compared with control group. Lipid peroxide (LPO) levels were significantly decreased (8.3% and 18.0%, 13.4% and 18.4%, respectively) in liver mitochondria and microsomes of SFP-2.5 and SFP-5.0 groups compared with control group. Oxidized protein (OP) levels were remarkably decreased about 19.0% and 24.4% in liver microsomes of SFP-2.5 and SFP-5.0 groups, but significantly decreased about 11.6% in liver mitochondria of SFP-5.0 group compared with control group.

Mn-SOD activities were remarkably increased (17.6% and 28.8%, respectively) in mitochondria of SFP-2.5 and SFP-5.0 groups, and Cu/Zn-SOD activities were also effectively increased (about 14.4%) in liver cytosol of SFP-5.0 groups, but significant difference between GSHPx activity in liver cytosol of these two groups could be not obtained. These results suggest that anti-aging effect of silk fibroin may play an effective anti-aging role in a attenuating a oxidative stress and increasing a scavenger enzyme activity in liver membranes.

Key Words – Silk fibroin, Superoxide dismutase (SOD), Lipid peroxide (LPO), Oxygen radical, Glutathione peroxidase (GSHPx), Oxidized protein (OP), Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), Superoxide radical (O_2^-)

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-6332, Fax : 051-628-6343
E-mail : jhchoi@pknu.ac.kr

서 론

석유화학공업이 발달하면서 양질의 화학섬유가 등장하면서 값비싼 명주가 사양화되고 이에 따라 양잠산업이 몰락의 위기를 맞고 있다. 그래서 지금은 실크가 단백질로서 그 가수분해산물인 실크 피브로인의 생리활성에 대한 연구가 한창 진행중에 있다. 중국 후한의 허신(許慎)이 편찬한 《설문해자(說文解字)》에 “상(桑)은 젊다(若)는 뜻으로서 신목(神木)이라는 별명을 갖고 있다”[25]는 사실에서 뽕나무(桑) 관련산물로서 뽕잎을 비롯하여 누에가루 및 실크 피브로인이 성인병을 예방하고 노화를 방지할 수 있다는 사실을 묵시적으로 암시하고 있다[7, 8].

최근들어 뽕잎 및 누에 추출물에 대한 연구는 상당히 진행되면서 누에가루 추출물을 이용한 기능성 음료까지 등장하고 있다[11, 12]. 그렇지만, 실크 피브로인에 대한 연구는 거의 되어 있지 않다. 실크 단백질의 가수분해산물인 올리고펩티드(oligopeptide)로서 실크 피브로인(silk fibroin)의 기능성 및 소화연구[17], 실크 가수분해 단백질의 분자량의 분포 및 소화에 관한 연구[2], 실크 피브로인의 혈청 콜레스테롤의 억제효과[16], 콜레스테롤의 대사에 있어서 할람 아미노산의 중요성[31], 실크 피브로인의 기능성 연구로서 기포성의 식품가공에의 이용[15] 및 견직물 잔사의 식품소재로서의 응용[23]에 관한 연구결과도 보고되어 있다. 따라서 본 연구는 실크 피브로인의 생리활성연구의 일환으로서 전보[9, 10]에 이어 간장조직의 활성산소 및 그 제거효소에 미치는 실크 피브로인의 영향을 분석하여 유의적인 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

동물실험 및 사료조성

한국화학연구소에서 구입한 Sprague Dawley계 랫트 (male, 160±10 g)를 구입하여 본 대학 동물사육실에서 2주 동안 예비사육한 다음, 7마리씩 3군으로 나누어 실험용 기본사료(control group)로서 사육하면서 농촌진흥청 잠사곤충부에서 가수분해하여 공급받은 실크 피브로인(silk fibroin : Mw 500) 분말(SFP)을 각각 2.5 및 5.0 g/kg BW가 되도록 사료에 첨가한 실험그룹(SFP-2.5 및 SFP-5.0 groups)으로 하여 6주간 사육실험을 행하여 간장중의 활성산소의 생성

및 그 제거효소의 활성에 미치는 실크 피브로인의 영향을 평가하였다. 동물사육실은 항온항습(22±2℃, 65±2% RH)하에서 12시간 사이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절된다.

조제사료의 조성

본 실험에 사용한 사료조성은 전보[9]와 같이 탄수화물 57.8% (α -corn starch: 44.5% + sucrose 13.3%), 단백질 16.0% (sodium-free casein), 지질 18.0% (lard 18.0%), 비타민과 무기질(AIN-76 mixture) 각각 1.0%, 3.5%, 그리고 섬유질 3.0%, DL-methionine 0.3%, choline chloride 0.2%를 첨가하였으며, 여기에 cholesterol 0.5% 및 sodium chloride 0.2%를 첨가하여 고콜레스테롤혈증을 유도하였다. 실험그룹의 사료조성은 실크 피브로인을 하루에 각각 2.5 및 5.0 g/kg BW가 섭취되도록 2.5% 및 5.0%의 SFP를 첨가하는 대신 탄수화물을 각각 2.5% 및 5.0%씩 제외하고 조제하였다.

간장조직의 분획

간장의 분획은 Laganier와 Burk[18]의 방법에 따라 HEPES완충용액(10 mM HEPES, 10 mM KCl, 280 mM sucrose, pH 7.4)을 사용하여 mitochondria, microsome 및 cytosol획분으로 분획하여 사용하였다. 이들 획분의 단백질의 함량은 Lowry 등[22]의 방법에 따라 측정하였다.

활성산소의 생성량 측정

히드록시 라디칼(\cdot OH)의 함량은 deoxyribose의 파괴정도로써 hydroxyl radical 생성정도를 측정하는 방법으로서, 간장획분의 산소대사산물에 의해 deoxyribose가 파괴되어 aldehyde가 생성되며, 이 aldehyde는 산성용액에서 thio-barbituric acid와 반응하여 발색되는 것을 이용한 Halliwell과 Gutteridge[13]의 방법에 따라 측정하였다. 간장획분중의 수퍼옥시드 라디칼($O_2^{\cdot-}$)의 생성량은 McCord와 Fridovch[24]과 Chan과 Bielski[1]의 방법에 따라 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 함유한 인산완충용액(pH 7.8) 420 μ l에 cyanide의 농도가 50 μ M이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 37℃에서 10분간 가온하였다. 이 용액에 cytosol 300 μ l와 0.1 mM cytochrome C 50 μ l를 넣어 분광광도계를 사용 550 nm에서 흡광도를 시간에 따라 측정하였다. 이 때 cytochrome C의 양은 분자

흡광계수 19,500 M⁻¹cm⁻¹로 계산하였다.

산화적 스트레스의 분석

간장획분중의 과산화지질의 함량은 Choi 등[3]이 사용한 방법에 따라 분광광도계를 사용하여 TBA법으로 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 함량을 측정하여 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량으로 표시하였다. 간장획분으로서 mitochondria와 microsome의 산화된 단백질의 함량은 Levine 등[21]의 방법에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 0.1 ml의 시료에 30% TCA (trichloroacetic acid)를 0.5 ml 혼합, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 뒤 잔사에 10 mM DNPH (dinitrophenyl hydrazine) 0.5 ml 첨가, 15분마다 혼합하며 1 시간 동안 실온에 방치 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol /ethyl acetate (v/v 1:1) 3.0 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 ml 첨가·혼합하여 37℃의 항온 수조에서 15분간 가온한 후, 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl group의 양은 360 nm와 370 nm 사이에 있는 흡광도의 파장에서 분자흡광계수(E=22,000)를 이용하여 계산하였다.

제거효소(scavenger enzymes)의 활성 측정

Oyanagui[27]의 방법에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD)의 활성은 간장의 mitochondria 및 cytosol획분을 사용하여 측정하였고, 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase : GSHPx)의 활성은 Lawrence와 Burk[19]의 방법에 따라 340 nm에서 NADPH

의 감소를 측정하기 위한 방법으로 간장의 cytosol획분에서 측정하였다.

분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test[30]로 실시하였다.

결과 및 고찰

활성산소의 생성 억제효과

강력한 독성산소로 알려진 활성산소(oxygen radicals)는 오염(농약 등 환경호르몬), 합성의약품의 남용, 흡연, UV나 X-선 조사 등이나 체내에서 대사중의 효소반응이나 염증반응에 의해서도 생성된다.

이들 활성산소는 조직세포를 공격하여 심장혈관관련 질병(成人病)을 유발하고 노화를 촉진하며 치매 등의 신경정신질환을 유발할 뿐만 아니라 암(cancer)까지도 유발한다는 사실이 밝혀져 있다[29]. 간장중의 활성산소중에서 가장 강력한 히드록시 라디칼($\cdot\text{OH}$) 및 수퍼옥시드 라디칼(O_2^-)의 생성에 미치는 SFP의 영향을 비교하여 보면 Table 1과 같다.

간장조직중의 mitochondria획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0 투여그룹의 $\cdot\text{OH}$ 생성은 8.10 ± 0.68 및 7.88 ± 0.79 nmol/mg protein/min으로서 대조그룹(8.60 ± 0.74 nmol/mg protein/min : 100%) 대비 각각 94.2% 및 91.6%로서, 5.8% 및 8.4%의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성 억제효과가 나타났지만, SFP-5.0투여그룹에서만 유의성이 인정되었다. 또한 microsome획분에서는 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹의 $\cdot\text{OH}$ 생성은 3.63 ± 0.29 및 3.35 ± 0.23 nmol/mg protein/min으로서 대조그룹(3.77 ± 0.54 nmol/mg protein/min : 100%) 대비

Table 1. Effects of SFP on hydroxyl and superoxide radicals in liver membranes of SD rats for 6 weeks

Membranes	Control	SFP-2.5	SFP-5.0
Hydroxyl radical(nmol/mg protein/min)			
Mitochondria	8.60 ± 0.74^a	8.10 ± 0.68 (94.2%) ^b	$7.88 \pm 0.79^*$ (91.6%)
Microsome	3.77 ± 0.54	3.63 ± 0.29 (96.3%)	$3.35 \pm 0.23^*$ (88.9%)
Superoxide radical(nmol/mg protein)			
Cytosol	38.82 ± 2.33	$32.87 \pm 2.12^{**}$ (84.7%)	$30.85 \pm 2.78^{***}$ (79.5%)

SFP-2.5 and SFP-5.0 : Silk fibroin powder of 2.5 and 5.0g/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 compared with control group

96.3% 및 88.9%로서, 각각 3.7% 및 11.1%의 ·OH 라디칼의 생성 억제효과가 나타났지만, SFP-5.0투여그룹에서만 유의성이 인정되었다. 따라서 이들 간장의 두 획분에서 SFP-5.0 투여그룹에서만 대조그룹 대비 8.4% 및 11.1% 유의적인 ·OH 라디칼 생성 억제효과가 인정되었다.

또한 간장의 cytosol 획분의 superoxide radical(O₂⁻)의 생성 억제효과는 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹의 O₂⁻의 생성은 32.87±2.12 및 30.85±2.78로서 대조그룹(38.82±2.33 nmol/mg protein : 100%) 대비 84.7% 및 79.5%로서, 각각 15.3% 및 20.5%의 매우 효과적인 O₂⁻의 생성 억제효과가 인정되었다. 이러한 사실은 간장조직중에서 뽕잎 추출물(MLE) 투여효과와는 거의 유사하지만, 누에분말(SWP) 투여효과와는 전혀 다른 양상으로서 매우 효과적인 O₂⁻의 생성 억제효과가 인정되었다.

산화적 스트레스의 평가

활성산소의 공격목표는 조직세포중의 지질 성분의 공격에 의한 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 생성, 단백질 성분의 공격에 의한 산화단백질(oxidized protein : OP)의 생성 및 핵산의 공격에 돌연변이의 생성 등을 들 수 있다. 따라서 이들 산화적 스트레스의 평가는 LPO는 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 함량이나 OP는 카르보닐그룹(>C=O group)의 함량 및 핵산의 산화에 의한 변이 등은 8-OHdG의 생성량을 측정하여 평가한다.

· 과산화지질의 생성 억제효과

세포막의 지질이 활성산소의 공격을 받아 산화될 때 생

성되는 LPO는 강력한 세포독성 때문에 성인병과 노화의 지표물질로 알려져 있다[4, 32-34]. 실크 피브로인의 투여에 의한 간장 조직중의 LPO의 생성에 미치는 영향을 비교하여 보면 Table 2와 같다. 간장조직의 mitochondria획분에서는 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹은 13.91±1.25 및 12.44±1.18 nmol/mg protein으로서 대조그룹(15.17±1.24 nmol/mg protein : 100%) 대비 각각 91.7% 및 82.0%로서 용량의 존적으로 8.3% 및 18.0%의 유의적인 LPO의 생성이 억제효과가 인정되었다.

간장조직의 microsome획분에서도 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹에서 11.50±0.95 및 10.83±0.66 nmol/mg protein으로서 대조그룹(13.28±1.15 nmol/mg protein : 100%) 대비 각각 86.6% 및 81.6%로서 용량의존적으로 13.4% 및 18.4%의 유의적인 LPO의 생성이 억제효과가 인정되었다. 실크 피브로인의 과산화지질의 생성 억제효과는 뽕잎 추출물 및 누에분말의 투여효과보다 더욱 효과적이란 사실은 매우 의미가 있을 것으로 기대된다.

· 산화단백질의 생성 억제효과

한편 간장조직의 단백질 성분이 활성산소의 공격을 받아 생성되는 카르보닐 그룹의 생성에 미치는 실크 피브로인(SFP)의 산화단백질(oxidized protein : OP) 생성 억제효과를 평가하기 위하여 카르보닐 그룹의 생성을 분석·비교하여 본 결과는 Table 3과 같다.

Mitochondria획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0그룹의 OP의 생성은 8.97±0.40 및 8.38±1.04 ng/mg protein으로서 대

Table 2. Effects of SFP on lipid peroxide(LPO) levels in liver membranes of SD rats for 6 weeks

Membranes	Control	SFP-2.5	SFP-5.0
Mitochondria	15.17±1.24 ^a	13.91±1.25* (91.7%) ^b	12.44±1.18*** (82.0%)
Microsome	13.28±1.15	11.50±0.95** (86.6%)	10.83±0.66*** (81.6%)

SFP-2.5 and SFP-5.0 : Silk fibroin powder of 2.5 and 5.0 g/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(nmol/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 compared with control group.

Table 3. Effects of SFP on oxidized protein (OP) levels in liver membranes of SD rats for 6 weeks

Membranes	Control	SFP-2.5	SFP-5.0
Mitochondria	9.48±1.12 ^a	8.97±0.40 (94.6%) ^b	8.38±1.04* (88.4%)
Microsome	7.86±0.55	6.37±0.48** (81.0%)	5.94±0.45*** (75.6%)

SFP-2.5 and SFP-5.0 : Silk fibroin powder of 2.5 and 5.0 g/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(ng/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 compared with control group.

조그룹의 OP의 생성량(9.48±1.12 ng/mg protein : 100%) 대비 94.6% 및 88.4%로서, 각각 5.4% 및 11.6%의 OP의 생성 억제효과가 나타났지만, SFP-5.0투여그룹에서만 유의성이 인정되었다. 그렇지만, microsome획분은 mitochondria 획분과는 달리 SFP-2.5 및 SFP-5.0그룹의 OP의 생성량은 6.37±0.48 및 5.94±0.45 ng/mg protein으로서 대조그룹의 OP의 생성량(7.86±0.55 ng/mg protein : 100%) 대비 81.0% 및 75.6%로서, 각각 19.0% 및 24.4%나 매우 효과적인 OP의 생성 억제효과가 인정되었다. 따라서 이러한 사실은 뽕잎 추출물이나 누에분말 투여그룹보다 실크 피브로인의 투여가 더욱 효과적으로 단백질산화(OP)를 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

제거효소의 활성 평가

간장획분중에서 활성산소의 제거효소로서 가장 중요한 수퍼옥사이드 디스무타아제(SOD) 및 글루타치온 퍼옥시다아제(GSHPx)의 활성에 미치는 실크 피브로인(SFP) 투여의 영향을 분석하여 보면 Table 4와 같다. 간장의 mitochondria획분중에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹의 Mn-SOD의 활성은 23.60±1.29 및 25.86±2.33 unit/mg protein으로서 대조그룹(20.07±3.66 unit/mg protein : 100%) 대비 117.6% 및 128.8%로서, 각각 17.6% 및 28.8%의 매우 효과적인 Mn-SOD활성의 증가효과가 인정되었다. 간장 cytosol획분중에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹의 Cu/Zn-SOD의 활성은 53.76±4.81 및 58.04±3.22 unit/mg protein으로서 대조그룹(50.74±4.51 unit/mg protein : 100%) 대비 106.0% 및 114.4%로서, 각각 6.0% 및 14.4%의 Cu/Zn-SOD의 활성 증가효과가 나타났지만, SFP-5.0투여그룹에서만 유의성이 인정되었다. 그렇지만, 간장의 cytosol획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여에 의한 GSHPx의 활성의 증가효과는 전혀 인

정할 수 없었다.

요 약

실크 피브로인(SFP)을 SD계 랫트에 하루 2.5 및 5.0 g/kg BW로써 6주간 투여하여 간장조직의 활성산소 및 그 제거효소의 활성에 미치는 영향을 분석·평가하였다. Mitochondria 및 microsome획분에서 SFP-5.0투여그룹에서만 대조그룹 대비 8.4% 및 11.1%의 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)의 생성 억제효과가 인정되었다. Cytosol획분의 superoxide radical(O_2^-)의 생성 억제효과도 $\cdot\text{OH}$ 라디칼과는 달리 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹에서 각각 15.3% 및 20.5%의 매우 효과적인 O_2^- 생성 억제효과가 인정되었다. 간장조직의 mitochondria 및 microsome획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹은 대조그룹 대비 각각 8.3% 및 18.0%, 13.4% 및 18.4%의 매우 효과적인 LPO의 생성 억제효과가 인정되었다. 간장조직중의 mitochondria획분에서는 SFP-5.0투여그룹에서 11.6%의 OP의 생성억제효과가 인정되었지만, microsome획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹에서 다같이 대조그룹 대비 19.0% 및 24.4%의 OP의 생성 억제효과가 인정되었다.

Mitochondria획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹의 Mn-SOD의 활성은 대조그룹 대비 각각 17.6% 및 28.8%의 매우 효과적인 Mn-SOD활성의 증가효과가 인정되었다. cytosol획분중에서 SFP-5.0투여그룹의 Cu/Zn-SOD의 활성은 대조그룹 대비 14.4%의 활성증가효과가 인정되었다. 그렇지만, 간장의 cytosol획분에서 SFP-2.5 및 SFP-5.0투여그룹의 GSHPx의 활성은 대조그룹 대비 전혀 유의성을 인정할 수 없었다. 이상의 결과에서 누에분말의 투여는 $\cdot\text{OH}$ 라디칼 및 O_2^- 등 산소라디칼의 생성을 효과적으로 억제

Table 4. Effects of SFP on SOD and GSHPx activities in liver membranes of SD rats for 6 weeks

Membranes	Control	SFP-2.5	SFP-5.0
Superoxide dismutase(unit/mg protein)			
Mn-SOD	20.07±3.66 ^a	23.60±1.29** (117.6%) ^b	25.86±2.33*** (128.8%)
Cu/Zn-SOD	50.74±4.51	53.76±4.81 (106.0%)	58.04±3.22** (114.4%)
Glutathione peroxidase(IU/g protein)			
GSHPx	5.06±0.61	5.12±0.36 (101.2%)	5.20±0.48 (102.8%)

SFP-2.5 and SFP-5.0 : Silk fibroin powder of 2.5 and 5.0g/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD with 7 rats per group; ^bPercent of control values; **p<0.01; ***p<0.001 compared with control group.

하여 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 Mn-SOD 및 Cu/Zn-SOD 등 제거효소의 활성을 효과적으로 증가시키므로 생체의 노화과정을 어느 정도 효과적으로 지연할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Chan, P. C. and B. H. J. Bielski. 1974. Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **249(4)**, 1317-1319.
- Chin, K., K. Iura, R. Aizawa and K. Hirabayashi. 1991. The digestion of silk fibroin by rat. *J. Seric. Sci.* **60(5)**, 402-403.
- Choi, J. H. and B. P. Yu 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* **13**, 61-64.
- Choi, J. H. (1991). Lipid peroxidation, aging and food restriction. *Kor. J. Biochem.* **23(1)**, 61-70.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1995. Brain synaptosomal aging : Free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. & Med.* **18(2)**, 133-139.
- Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee and H. S. Kim. 1999. Effects of PNE on oxygen radicals and their scavenger enzymes in liver of SD rats. *Korea. J. Life Sci.* **9(4)**, 466-472.
- Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, K. S. Ryu and W. C. Lee. 1999. Effects of mulberry leaf extract on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 135-140.
- Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, H. S. Lee and K. S. Ryu. 1999. Effects of silkworm powder on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 141-146.
- Choi, J. H., D. I. Kim, D. W., Park, S. H., D. W. Kim, J. S. Lee and Y. W. Lee. 1999. Effects of silk fibroin powder on oxygen radicals and their scavenger enzymes in serum of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 216-221
- Choi, J. H., D. I. Kim, D. W., Park, S. H., J. M. Kim, J. S. Lee and K. G. Lee, J. H. Yeo and Y. W. Lee. 2000. Effects of silk fibroin on oxidative stress and membrane fluidity in brain of SD rats. *Korean J. Seric. Sci.* **42**, (submitted).
- Choi, J. H. and President of RDA. 1999. Functional anti-diabetic drink. *Korean Patent Application No.* 99-61216(Dec. 23, 1999).
- Choi, J. H. and President of RDA. 2000. Functional anti-diabetic drink. *Japanese Patent Application No.* 2000-98434(Mar. 31, 2000).
- Halliwell, B. and G. M. C. Gutteridge. 1981. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the persence of iron salts. *FEBS Lett.* **128**, 347-350.
- Hirabayashi K. 1989. Application of water soluble silk. *Bio Industry* **6(10)**, 27-32.
- Hirao, K., Y. Kimura and K. Igarashi. 1988. Foaming properties of fibroin solution prepared from silk yarn and utilization of Foam for making sponge cake. *J. of the Japanese Sec. for Food Sci. and Technology* **45(11)**, 692-699.
- Hirao, K., Tukakoshi, S. and Igarashi, m, K. 1999. Effects of fibroin foam powder prepared from silk yarn on serum cholesterol concentration in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **52(4)**, 219-223.
- Hirobayashi, K., K. Chin and T. Sebata. 1991. Utilization of silk fibroin as food ingredient. *New Food Industry* **33(11)**, 1-4.
- Laganriere, S. and B. P. Yu. 1987. Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commn.* **145**, 1185-1191.
- Lawrence, R. A. and R. F. Burk. (1978). Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *Lipid* **19**, 444-452.
- Lebel C. P., I. N. Odunze Jr and S. C. Bondy. 1989. Perturbations in cerebral oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163(2)**, 860-866.
- Levine, R L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel and E. R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1986**, 464-478.
- Lowry, O. H., N. J. Roseborough, L. A. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lu, X., D. Akiyama, K and Hirabayashi. 1994. Production of silk powder and properties. *J. Seric. Sci.* **63**, 21-27.
- McCord, J.M. and I. Fridovch. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (he-

- mocuprein). *J. Biol. Chem* **244(22)**, 6049-6055.
25. Namba, T. 1980. Colored Illustrations of WAKAN-YAKU Vol. II. pp. 82-83.
26. Odaka, H., n. Miki, H. Ikeda and T. Matsuo. 1992. Effect of disaccharidase inhibitor, AO-128, on postprandial hyperglycemia in rats. *J. Japan Soc. Nutr. Food Sci.* **45(1)**, 27-31.
27. Oyanagui, Y. 1984. Revaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **42**, 290-296.
28. Shiomi, S., D. Habu, T. Takeda, S. Nishiguchi, T. Kuroki, T. Tanaka, K. Tsuchida and S. Yamagami. 1998. Significance of peptidoglycan in patients with chronic liver diseases. *J. New Remedies & Clinics.* **47(1)**, 32-37.
29. Singh, V. A. 1992. A current perspective on nutrition and exercise. *J. Nutr.* **122(3S)**, 760-765
30. Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGrawhill, New York.
31. Sugiyama, K. 1989. Importance of sulfur-containing amino acids in cholesterol metabolism. *J. Japan Soc. Food & Nutr.* **42**, 353-363.
32. Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* **45**, 337-351.
33. Yu, B. P. 1996. Aging and oxidative stress : Modulation by dietary restriction. *Free Rad Biol. Med.* **21**, 651-668.
34. Yu, B. P. and R. Yang. 1996. Critical evaluation of free radical theory of aging: A proposal of oxidative stress hypothesis. *Ann. New York Acad. Sci.* **786**, 1-11.