

진피 에탄올 추출물이 Alloxan에 의해 유도된 HIT-T15 세포의 산화적 손상에 미치는 영향

정희경¹ · 정유석¹ · 박치덕¹ · 박창호¹ · 홍주헌^{2*}

¹(재)대구테크노파크 바이오산업지원센터

²대구가톨릭대학교 외식식품산업학부

Effect of the Ethanol Extract from Citrus Peels on Oxidative Damage in Alloxan-induced HIT-T15 Cell

Hee Kyoung Jung¹, Yoo Seok Jeong¹, Chi-Deok Park¹, Chang-Ho Park¹, and Joo-Heon Hong^{2*}

¹Bio Industry Center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of ethanol extract from citrus peels (CP-Et) against the alloxan-induced oxidative damage on HIT-T15, Hamster pancreatic β -cell. Total polyphenol and flavonoid contents in CP-Et were 57.00 ± 2.91 mg/g and 8.11 ± 2.83 mg/g, respectively. Cell toxicity on HIT-T15 by CP-Et (0.125~0.75 mg/mL) was not observed. CP-Et (0.125 mg/mL) increased cell proliferation rate of HIT-T15, which was treated alloxan ($IC_{50} = 11.58$ mM) (cell viability = $80.52 \pm 3.29\%$ of normal cell, $p < 0.05$). In comparison with insulin secretion of oxidative damaged HIT-T15, 1.5 fold (116.93 ± 2.11 μ g/mg protein) was increased by treatment CP-Et treatment (0.125 mg/mL) in HIT-T15 ($p < 0.05$). These results showed that CP-Et contribute to repairing cells and improvement of insulin expression on oxidative stress pancreatic β -cell, and also suggested application of CP-Et as a functional food material for type 2 diabetes.

Key words: citrus peels, oxidative damage, insulin secretion, alloxan, HIT-T15 cell

서 론

당뇨병은 비만과 함께 국민 보건상 위협을 가하는 만성질환으로 매해 그 발병율이 증가되고 있다. 당뇨병은 1형 당뇨와 2형 당뇨 두 가지로 나누어 볼 수 있으며, 인슐린 의존성인 1형 당뇨병은 어린이에게 일반적으로 나타나는 것으로 자가 면역 장애에 의해 선천적으로 베타세포에서 인슐린 생산을 할 수 없는 경우를 말한다(1). 반면, 주로 성인에서 나타나는 인슐린 비의존성인 2형 당뇨는 인슐린에 대한 말초조직의 저항성 증가에 의해 포도당 이동이 감소된 것이다(2). 최근 Butler 등(3)은 2형 당뇨에서 인슐린 분비의 감소는 β -cell replication과 apoptosis 경로에 불균형이 야기되어 상대적으로 β -cell의 apoptosis가 증가하여 일어나는 것으로 보고하였다. 또한 β -cell의 apoptosis는 혈중 glucose 농도에 의해 촉진되는 것(4)으로 알려져 있으며, 고농도 glucose에 β -cell의 장기간 노출은 인슐린의 gene expression을 감소시켜 β -cell의 손상이 일어나도록 하는 glucose toxicity 현상을 일으킨다(5). 이뿐만 아니라 cytokine 자극 후 유도되는

reactive oxygen species(ROS)와 nitric oxide(NO)도 β -cell의 손상에 영향을 주는 것으로 알려지고 있는데 특히, ROS는 인슐린 합성을 억제하고 apoptosis를 유도시키는 것으로 알려져 있다(6). 즉, 2형 당뇨에 있어 산화적 스트레스는 β -cell의 손상을 증가시킬 수 있다는 것으로 2형 당뇨 환자 혈청에서 조직의 산화적 스트레스 마커인 8-hydroxydeoxy-guanine, 4-hydroxy-2-nonenal protein, 8-epi-prostaglandin F2a 등이 증가되었다는 보고도 있다(7). 따라서 2형 당뇨환자에 있어 베타세포의 기능을 보존하여 인슐린 저항성 개선하는 방법으로 vitamin E나 lipoic acid와 같은 항산화제 섭취를 제안하기도 하였다(8).

동양에서는 오래전부터 몇 가지 유용 식물들을 질환 치료를 위해 이용하였다. 특히, 이러한 식물들에는 폴리페놀이나 플라보노이드와 같은 기능성 phytochemical성 물질을 함유하며, 이러한 물질은 항산화 활성이 아주 우수하다(9). 따라서 이러한 천연물로부터 항산화제를 찾으려는 많은 연구들이 진행되고 있으며, 최근 부각되고 있는 기능성식품 소재 중 하나인 진피(*Citrus unshiu*)도 오래전부터 한약재로 사용

*Corresponding author. E-mail: jhhong@cu.ac.kr
Phone: 82-53-850-3218, Fax: 82-53-850-3218

되었으며, 페놀성 화합물과 플라보노이드 함량이 높고 항산화 활성이 우수하다고 보고되고 있다(10). 또한 Bok 등(11)의 연구에 따르면 진피는 혈중 콜레스테롤 및 간에서 콜레스테롤 합성의 저해에도 효과가 있는 것으로 나타났다. 감귤은 2008년 63.6만 톤으로 국내에서 생산량이 가장 높은 과일로 이에 따라 처리해야 하는 감귤의 부산물인 감귤 과피도 증가하고 있는 실정이다(12). 최근 2형 당뇨병 환자에서 산화적 스트레스에 의한 췌장 세포의 손상과 이로 인한 인슐린 분비 기능저하에 대해 항산화 활성을 가지는 식물자원을 이용하여 췌장세포를 보호하고자 하는 연구들이 진행되고 있다(13-15).

따라서 본 연구에서는 진피 에탄올 추출물의 항산화 효과를 통해 췌장세포의 손상 회복 및 인슐린 분비 조절능을 검토하여, 2형 당뇨병에서 산화적 스트레스 저하를 통한 β -cell의 손상을 예방할 수 있는 기능성 소재로의 이용 가능성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용된 진피는 (주)음니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 이용하였으며, 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 또한 Hamster pancreatic β -cell인 HIT-T15 cell line은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 계대 배양을 하면서 본 연구에 이용하였고 세포 배양에 사용된 배지인 RPMI-1640, FBS, penicillin, streptomycin은 (주)웰진(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

시료준비

실험 시료는 진피 83.75 g에 80% 에탄올을 1 L 첨가하고 24시간 동안 60°C에서 추출 후 이를 방냉 한 다음 Whatman paper(No. 2)로 여과하였다. 이 여과액을 감압농축기(Rotary Vacuum Evaporator, N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 40°C에서 농축하고 동결건조기(Freeze Dryer, PVTFD10R, Ilshin lab, Yangju, Korea)로 -40°C에서 건조한 분말을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해하여 분석용 시료로 이용하였다. 이때 추출수율은 동결건조 후 무게를 측정하여 원료량에 대한 백분율로 계산하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법(16)을 이용하여 분석하였다. 실험 시료는 증류수로 3배 희석하여 이용하였으며, 희석액 1 mL에 5 mL 1/10 Folin-Ciocalteu reagent를 첨가하고 상온에서 5분간 반응시킨 후 7.5% sodium carbonate(NaCO_3)를 4 mL 첨가하였다. 그리고 상온에서 1시간 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 각 추출물의 자체 흡광도 값에 시료에 의한 흡광도 값을 제거하고

tannic acid를 표준곡선으로 이용하여 총 폴리페놀 함량을 정량하였다.

총 플라보노이드 함량은 Jia 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1 mL에 5% sodium nitrite solution(NaNO_2) 150 μL 를 넣어 상온에서 5분간 반응시켰으며, 10% aluminium(III) chloride solution(AlCl_3) 300 μL 를 첨가하여 상온에서 5분간 반응시킨 뒤 1 M-sodium hydroxide(NaOH)를 1 mL 넣어 혼합한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin을 정량하여 작성한 표준 곡선을 이용하여 mg/g으로 나타내었다.

전자공여능

전자공여능은 stable radical인 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 대한 환원력을 측정한 것으로 Lee 등(18)의 방법에 따라 분석하였다. DPPH reagent 5 mL에 각 시료를 0.5 mL 첨가한 후, 상온에서 15분간 반응시킨 뒤 microplate reader(Asys UVM340, Biochrom, Cambridge, UK)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 대조구와 함께 측정하였으며, 시료구와 대조구의 흡광도 값을 이용하여 백분율로 나타내었다.

세포 배양 및 독성 시험

HIT-T15는 10% FBS 및 100 unit/mL penicillin, 100 ng/mL의 streptomycin을 첨가한 RPMI-1640(glucose 11.1 mM 포함)배지로 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다(13). 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)의 처리 농도 결정은 HIT-T15에 대한 세포 독성 검사로 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)법을 이용하여 측정하였다. 즉, 24 well plate에 well 당 10^4 개의 세포를 분주한 다음 24시간 배양하고 DMSO로 용해시킨 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)을 첨가한 다음 24시간 추가로 배양하였다. 그 다음 각 well에 MTT(5 mg/mL)를 첨가하고 4시간 반응 후 상등액을 제거하고 DMSO를 300 μL 첨가하여 formazan을 충분히 용해시켜 microplate reader(Asys UVM340, Biochrom)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무처리군을 100%로 하여 세포성장 억제율을 측정하였다.

Alloxan 유도에 따른 HIT-T15의 세포 생존율 및 인슐린 분비능 측정

Alloxan에 의해 유도된 HIT-T15 손상으로부터 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)에 의한 췌장 세포 손상 억제에 대하여 조사하기 위해 HIT-T15를 24 well plate에 well 당 10^4 개의 세포를 분주하고 DMSO에 용해한 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)을 37°C에서 1시간 동안 처리한 다음 다시 alloxan을 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 추가 반응시킨 후 HIT-T15 cell에 대한 세포 생존율을 MTT법으로 분석하였다. 또한 이때 상등액에 분비된 인슐린의 양은 Mercordia high range rate insulin ELISA(Mercordia AB,

Uppsala, Sweden)를 사용하여 측정하였으며, 단백질량은 Bradford reagent(Thermo, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 분석한 후 최종적으로 단백질당 인슐린 분비량으로 나타내었다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA) program을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 전자공여능

진피 에탄올 추출물의 추출수율은 동결건조 분말 무게를 측정하여 원료량에 대한 백분율로 계산한 결과, 30.74%로 Hyon 등(12)의 감귤류 진피에 대한 추출수율과 유사하였다. 식물체 페놀 화합물은 2차 대사산물로 항산화 활성은 페놀성 화합물 함량과 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(19). 또한 감귤 과피는 hesperidin이나 naringin과 같은 플라보노이드 물질을 함유하고 있으며, 이들도 항산화와 같은 기능성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(20). 따라서 본 연구에서는 항산화 활성에 영향을 줄 수 있는 생리활성 물질로 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)로부터 총 폴리페놀함량과 총 플라보노이드 함량을 측정하고, 각각 57.00±2.91 mg/g, 8.11±2.83 mg/g으로 나타났으며, 추출물의 전자공여능에 의한 항산화 활성은 8.11±2.83%로 Jeong 등(15)이 보고한 진피 에탄올 추출물의 전자공여능과 비교 시 다소 낮았으며, 이는 총 폴리페놀 함량의 차이에 의한 것으로 사료된다(Table 1).

Alloxan 및 진피 에탄올 추출물 농도에 따른 HIT-T15의 세포독성

HIT-T15의 2형 당뇨병에서 산화적 손상을 유도하기 위해 Fig. 1과 같이 alloxan 농도 1~15 mM까지 HIT-T15에 처리한 결과, alloxan 처리 농도가 증가됨에 따라 HIT-T15 세포의 생존율은 감소하였으며, alloxan 11.58 mM에서 약 50%의 세포독성이 일어남을 확인하였다.

또한 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et) 농도에 따른 세포 생존율을 조사한 결과, Fig. 2와 같이 0.125~0.75 mg/mL에서 100.90±1.51~97.56±0.73%의 세포 생존율을

Table 1. Total polyphenol, flavonoid contents and DPPH radical scavenging ability of the ethanol extract from citrus peels

Total phenolic compound contents (mg/g)	57.00±2.91
Total flavonoid compound contents (mg/g)	8.11±2.83
Electron donating ability (%)	14.82±2.04

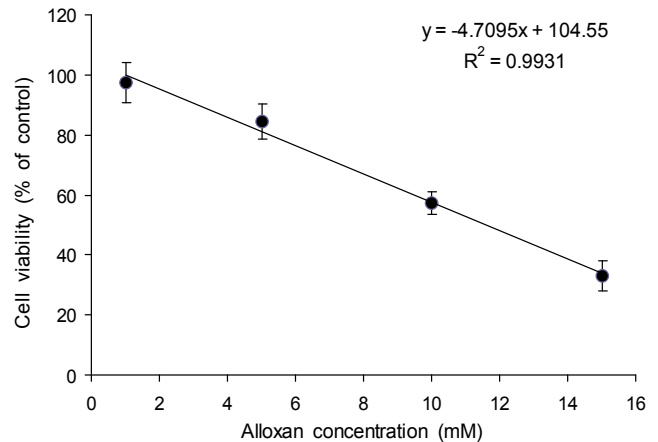


Fig. 1. Effect of various concentrations of alloxan on cell viability of HIT-T15 cells. The values showed as mean±standard deviation (n=3).

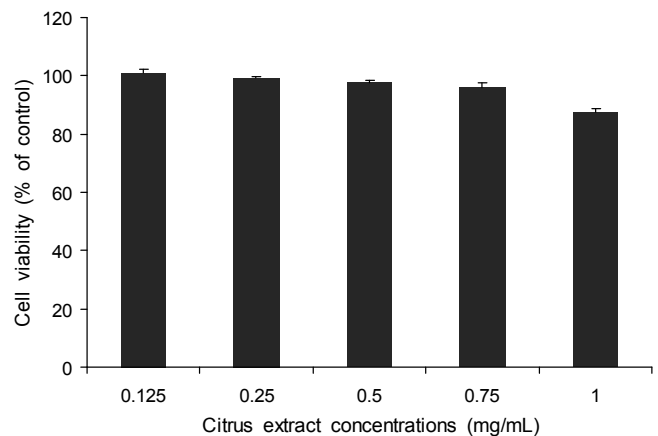


Fig. 2. Effect of the ethanol extract from citrus peels on cell viability of HIT-T15 cells. The values showed as mean±standard deviation (n=3).

나타내어 CP-Et의 농도 0.75 mg/mL까지는 세포 독성이 없음을 확인하였다. 따라서 HIT-T15 세포에 대한 CP-Et의 처리 농도는 0.125~0.75 mg/mL로 결정하였다.

산화적으로 손상된 HIT-T15에 미치는 영향

상기 결과를 기초로 하여 HIT-T15에 alloxan을 처리하여 50%까지 산화적 세포 손상을 유도하고 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)에 의한 세포 회복에 대해 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과, Fig. 3과 같이 IC₅₀ 농도인 alloxan 11 mM을 처리한 대조구에서 무처리구와 비교 시 52.41±5.73%의 세포 생존율을 보였다. 그러나 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL 농도의 CP-Et를 처리한 결과, HIT-T15 생존율은 각각 80.52±3.29, 74.17±6.75, 67.53±5.8%로 CP-Et의 처리 농도에 따라 유의성 있게 증가되어 CP-Et는 췌장세포의 산화적 손상을 보호할 수 있음을 확인할 수 있었다(p<0.05).

Alloxan은 생체 내에서 다양한 환원물질에 의해 dialuric acid로 환원되거나 dialuric acid는 불안정하여 산소가 존재할 경우 superoxide anion radical 및 hydrogen peroxide 등을 생성시키면서 alloxan으로 산화된다(21). Ramkumar 등(22)

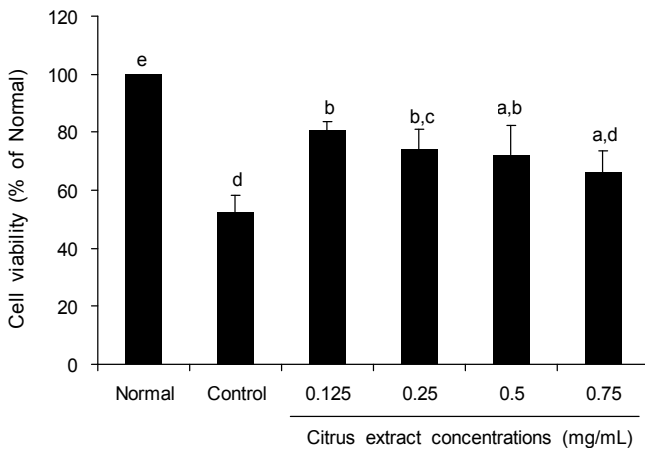


Fig. 3. Effect of the ethanol extract from citrus peels (CP-Et) on cell proliferation of alloxan damaged HIT-T15. The value showed as mean \pm standard deviation (n=3). Each value was considered statistically different at $p < 0.05$. Normal was only treated with DMSO (dimethyl sulfoxide as solvent for dissolving CP-Et), and control was added DMSO and 11 mM alloxan (IC_{50}). CP-Et was preincubated for 1 hr at 37°C before treatment of alloxan in HIT-T15.

은 insulinoma cell인 HIT-T15에서 alloxan의 처리 시 HIT-T15의 ROS 수준이 증가함에 따라 세포독성이 나타남을 확인하였다. 따라서 산화적으로 손상된 HIT-T15에서 CP-Et에 의한 세포 보호효과는 alloxan 산화 반응에서 생성된 ROS를 CP-Et의 항산화 활성으로 제거하여 ROS에 의한 HIT-T15의 손상을 방어함으로써 세포 생존율을 높인 것으로 사료된다.

인슐린 분비능에 미치는 영향

동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et)에 의해 산화적 손상을 회복한 HIT-T15 세포에서 인슐린 분비능의 변화를 조사한 결과, Fig. 4와 같이 인슐린 분비능은 alloxan으로 산화적 손상을 유도하지 않은 normal군에서 $112.99 \pm 1.15 \mu\text{g}/\text{mg}(\text{protein})$ 으로 나타났으며, IC_{50} alloxan 농도로 처리한 대조군에서는 $73.64 \pm 4.52 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 약 35%의 인슐린 분비가 감소되었다.

반면 CP-Et를 처리한 HIT-T15 세포에서는 산화적 손상에 대한 세포 생존율과는 다르게 0.125 mg/mL 농도에서 $116.93 \pm 2.11 \mu\text{g}/\text{mg}(\text{protein})$ 로 대조군과 비교 시 인슐린 분비가 유의적으로 증가되었음을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

Alloxan 유도에 의해 산화적으로 손상된 HIT-T15에서 CP-Et(0.125 mg/mL) 처리는 세포 생존율뿐만 아니라 인슐린 분비능도 개선되는 것으로 보아 CP-Et는 산화적 스트레스로부터 췌장세포 손상을 방어하고 이에 따라 β -cell mass의 증가로 인슐린 분비가 증대된 것으로 사료된다. 또한 CP-Et의 고농도 처리는 비정상적인 HIT-T15의 인슐린 분비를 감소시켰다. 이러한 결과는 Xiang 등(23)의 연구결과와 유사하였으며, β -cell의 산화적 손상 방어를 목적으로 고농도의 당 상태에서 유효 농도 이상의 항산화제 처리는 높은 삼투압과 ROS 생성을 야기하여 오히려 인슐린 분비능을 감소

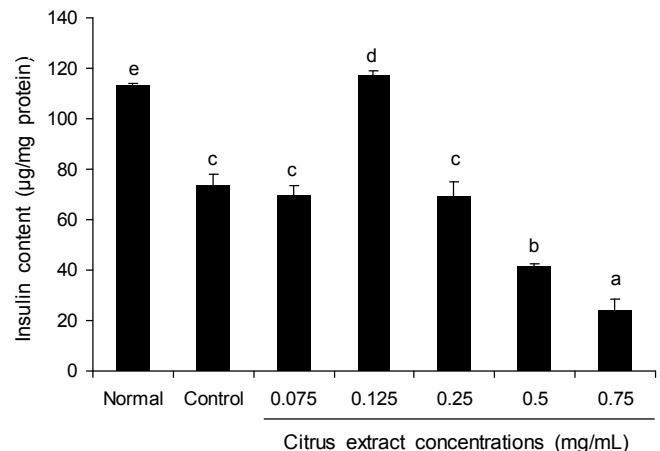


Fig. 4. Effect of the ethanol extract from citrus peels (CP-Et) on insulin secretion of alloxan damaged HIT-T15. The value showed as mean \pm standard deviation (n=3). Each value was considered statistically different at $p < 0.05$. Normal was only treated with DMSO (dimethyl sulfoxide as solvent for dissolving CP-Et), and control was added DMSO and 11 mM alloxan (IC_{50}). CP-Et was preincubated for 1 hr at 37°C before treatment of alloxan in HIT-T15.

시킬 수 있음을 본 연구에서도 확인할 수 있었다. β -cell에서 산화적 스트레스는 β -cell의 기능 파괴를 유도하여 glucose toxicity를 일으키는데 hyperglycemia 상태에서 glycolysis를 통해 glucose-6 phosphate, fructose와 같은 환원당의 생산은 증가되며, 이들은 protein glycosylation 반응을 촉진하면서 ROS를 생산하고 이런 것들이 또 다시 β -cell 손상을 일으킨다(24). 즉, 2형 당뇨에서 산화적 스트레스에 대한 보호가 없는 경우 β -cell 손상이 반복적으로 일어나게 되고 이에 따라 β -cell 기능은 점점 저하되게 된다. 따라서 2형 당뇨에서는 혈당조절뿐만 아니라 산화적 스트레스로부터 β -cell 보호가 동시에 이루어져야한다. 본 연구에서는 CP-Et의 항산화 효과를 확인하고 산화적 손상을 일으킨 β -cell인 HIT-T15에서 CP-Et의 항산화 효과에 의해 손상된 β -cell의 생존율 증가와 이에 따른 인슐린 분비능 개선이 유의성 있게 나타남을 확인하였다.

Kaneto 등(25)은 당뇨 실험동물에서 항산화제 식이가 β -cell의 양적 증가와 인슐린 분비를 증가시킬 수 있다고 하였는데 이러한 보고로 미루어 볼 때 CP-Et의 섭취는 산화적 스트레스가 반복되는 2형 당뇨 환자에서 산화적 방어 역할을 하여 β -cell 양의 감소와 인슐린 저항성에 대한 개선이 가능함을 확인하였다.

요 약

본 연구는 진피 에탄올 추출물의 alloxan에 의해 유도된 HIT-T15 세포의 산화적 손상으로부터 세포 생존율 및 인슐린 분비 조절능에 대해 조사하였다. 진피 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 각각 $57.00 \pm 2.91 \text{ mg/g}$, $8.11 \pm 2.83 \text{ mg/g}$ 으로 나타났으며

alloxan 처리 농도가 증가됨에 따라 HIT-T15 세포의 생존율은 감소하였으며, alloxan 11.58 mM에서 약 50%의 세포 독성이 일어남을 확인하였다. 동결건조 된 진피 에탄올 추출물(CP-Et) 0.125~0.75 mg/mL 농도에서 무처리구의 세포 생존율은 $100.90 \pm 1.51 \sim 97.56 \pm 0.73\%$ 로 나타나 HIT-T15 세포에 대한 CP-Et의 처리 농도는 0.125~0.75 mg/mL로 결정하였다. 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL 농도의 CP-Et를 처리한 결과, alloxan에 의해 유도된 산화적 세포손상으로부터 세포 생존율이 각각 80.52 ± 3.29 , 74.17 ± 6.75 , $67.53 \pm 5.8\%$ 로 나타나 유의성 있게 보호되어짐을 확인하였다. CP-Et를 처리한 HIT-T15 세포에서는 산화적 손상에 대한 세포 생존율과는 다르게 0.125 mg/mL 농도에서 $116.93 \pm 2.11 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 인슐린 분비가 대조구와 비교 시 유의적으로 증가되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 진피 에탄올 추출물에 의한 항산화적 방어로 2형 당뇨의 β -cell 양의 감소와 인슐린 저항성에 대한 개선이 가능함을 제시하며, 그 작용 기작에 대해서는 차후 더 많은 연구가 필요하다 하겠다.

문 헌

- Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengård J, Kesäniemi YA. 1992. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35: 1060-1067.
- Koro CE, Bowlin SJ, Bourgeois N, Fedder DO. 2004. Glycemic control from 1988 to 2000 among US adults diagnosed with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 17-20.
- Butler AE, Janson J, Susan BW, Rizzan RA, Butler PC. 2003. β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110.
- Wilkin TJ. 2001. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia* 44: 914-922.
- Robertson PR, Harmon JH, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. 2003. Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587.
- Ei-Afly AT, Ahmed AAE, Fantani AJ. 2005. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacol Res* 52: 264-270.
- Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. 2004. β -Cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 119-124.
- Ruhe RC, McDonald RB. 2001. Use of antioxidant nutrients in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* 20: 363-369.
- Repetto MG, Llesuy SF. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 35: 523-534.
- Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem* 46: 2123-2129.
- Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA:cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 129: 1182-1185.
- Hyon JS, Kang SM, Mahinda S, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. 2010. Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Korean J Food Cookery Sci* 26: 88-94.
- Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. 1998. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 33: 689-695.
- Tanaka Y, Gleason CE, Tran POT, Harmon JS, Robertson RP. 1999. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 14: 10857-10862.
- Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem* 52: 3389-3393.
- Claudia A, Graciela EF, Rosana F. 2008. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J Agric Food Chem* 56: 9225-9229.
- Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
- Lee EJ, Kim JS, Kwon JH. 2008. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. *Korean J Food Preserv* 15: 840-846.
- Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. 2009. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 15-20.
- Hyon JS, Kang SM, Mahinda S, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. 2010. Antioxidative activities of enzymatic digests from dried *Citrus unshiu* and *Citrus grandis* peels. *Korean J Food Cookery Sci* 26: 18-25.
- Zhang H, Ollinger K, Brunk U. 1995. Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. *Diabetologia* 38: 635-641.
- Ramkumar KM, Manjula C, Sankar L, Suriyanarayanan S, Rajaguru P. 2009. Potential in vitro antioxidant and protective effects of *Gymnema montanum* H. on alloxan-induced oxidative damage in pancreatic beta-cells, HIT-T15. *Food Chem Toxicol* 47: 2246-2256.
- Xiang L, Huang X, Chen L, Rao P, Ke L. 2007. The reparative effects of *Momordica Charantia* Linn. extract on HIT-T15 pancreatic beta-cells. *Asia Pac J Clin Nutr* 16: 249-252.
- Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A, Kawamori D, Yasuda T, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. 2002. Probuco preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pr* 57: 1-10.
- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. 1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48: 2398-2406.