

OLETF 쥐에서 칠면초와 세발나물의 인슐린 저항성 개선 효과

조정용 · Zhangjun Huang · 박선영 · 박경희 · 배동근¹ · 김소영² · 김행린² · 함경식*
목포대학교 식품공학과 및 천일염연구센터, ¹안양대학교 식품영양학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원

The Effects of Several Halophytes on Insulin Resistance in Otsuka Long-evans Tokushima Fatty Rats

Jeong-Yong Cho, Zhangjun Huang, Sun-Young Park, Kyung-Hee Park, Tong-Kun Pai¹,
So-Young Kim², Haeng-Ran Kim², and Kyung-Sik Ham*

Department of Food Science & Biotechnology and Solar Salt Research Center, Mokpo National University

¹Department of Food and Nutrition, Anyang University

²Division of Functional Food & Nutrition, National Academy of Agricultural Sciences, Rural Development Administration (RDA)

Abstract We evaluated preventive effects of *Suaeda japonica* (SJ) and *Spergularia marina* Griseb (SMG) on the insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. The 10-week old OLETF rats were fed diets containing 3% (w/w) SJ and SMG for 18 weeks. Fasting blood glucose levels in SJ and SMG groups, measured using the oral glucose tolerance test, were lower than that of the control rats. The SMG group showed significantly lower levels of insulin, glycated hemoglobin, triglyceride, and total cholesterol than the control group. In addition, these levels were relatively lower in the SJ group than those in the control rats. The SJ and SMG groups had relatively lower protein levels of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 in adipose tissue and serine phosphorylated insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in skeletal muscle than the control group. These results suggest that SJ and SMG prevent insulin resistance and SMG in particular reduces blood triglyceride and total cholesterol levels.

Keywords: halophyte, *Suaeda japonica*, *Spergularia marina*, insulin resistance, oxidative stress

서 론

당뇨병(Diabetes mellitus)은 생활수준 향상과 식생활의 변화로 인해 그 유병률이 지속적으로 증가하고 있다(1). 또한 당뇨병은 암 및 심혈관질환과 더불어 개인뿐만 아니라 사회적·경제적으로 미치는 영향이 매우 크므로, 그 예방 및 치료는 매우 중요하다. 특히 제 2형 당뇨병은 환자에게서 공통적으로 고혈당을 나타내고 다양한 원인에 의해 유발되나, 그 중 인슐린저항성과 밀접한 관계를 갖는다고 보고되고 있다(2,3).

인슐린 저항성은 췌장의 베타세포에서 인슐린이 정상적으로 분비되나 인슐린작용이 떨어진 상태로, 비만이나 고지방식이에 의한 내당능장애 환자에서 주로 발견된다고 보고된 바 있다(2,3). 인슐린 저항성이 있을 경우 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 늘려 hyperinsulinemia 상태로 정상 혈당 수준을 유지하나, 인슐린 저항성이 지속될 경우 인슐린 분비능이 점차 떨어져 혈당 상승과 함께 제 2형 당뇨병이 생기는 것으로 알려져 있다(3,4).

인슐린 저항성은 혈관질환 등 다른 대사성질환을 발생시키는

원인이 된다고 보고된 바 있다(4). 또한 산화스트레스는 인슐린 저항성을 유발시키는 주요 원인 인자이기도 하다 (5,6). 그러므로 산화스트레스 감소와 인슐린저항성 개선은 제 2형 당뇨병을 비롯한 다양한 대사성질환의 유병률을 낮출 수 있을 것으로 예상된다. 특히 식품 중 항산화 활성이 우수한 채소 섭취는 산화스트레스를 줄여주고 인슐린 저항성 등 각종 질병의 예방에 도움이 된다고 보고되고 있다(4,5,7). 그러므로 산화스트레스 억제와 인슐린 저항성을 개선하는 효과를 갖는 유용 채소의 발굴은 매우 의미 있는 연구일 것이다.

염생식물은 해안가, 염습지, 염호숫가 및 염사막 등에서 염에 내성을 갖고 자라는 식물로, 전 세계적으로 1,500여 종 이상이 서식하고 있다(8). 특히 염생식물은 육상식물과 달리 염 stress로부터 자신을 보호하기 위해 삼투압 조절을 통한 세포기능 보호 등 다양한 자기 방어 기작과 함께 페놀성 화합물을 포함한 2차 대사산물을 다량 함유하고 있다고 보고되고 있다(9). 최근 염생 식물들에 대한 유용성분 및 생리활성이 밝혀지면서 식품이나 의약품 소재로 주목받고 있다(10).

우리나라는 삼면이 바다이고 서해안의 넓은 갯벌지역에 약 40여 종 이상의 염생식물이 분포되어 있다(11,12). 염생식물이 서식하고 있는 주변에 사는 사람들은 오래전부터 함초를 비롯한 나문재, 해홍나물, 칠면초, 그리고 세발나물 등 다양한 염생식물을 식용이나 약용으로 이용하여 왔다. 특히 함초는 항당뇨, 항산화, 면역증강, 항암 등의 다양한 생리활성(13-15)을 나타내며 flavonoid 배당체들과 dicaffeoyl quinic acid류 등을 비롯한 다양한 유용성분(16-18)이 함유되어 있다고 보고되고 있다. 이러한 함초의 우수

*Corresponding author: Kyung-Sik Ham, Department of Food Science & Biotechnology and Solar Salt Research Center, Mokpo National University, Muan, Jeonnam 534-729, Korea
Tel: 82-61-450-2425
Fax: 82-61-454-1521
E-mail: ksham@mokpo.ac.kr
Received September 17, 2013; revised November 25, 2013;
accepted December 2, 2013

한 기능성이 알려지면서 채소, 젤러드, 그리고 발효식품 등의 다양한 식품 형태로 널리 소비되고 있다. 그러나 함초를 제외한 그 외 다양한 염생식물들은 식품 등의 다른 소재로 활용되지 못하고 있는 실정이다.

칠면초(*Suaeda japonica*)는 함초와 같은 명아주과(Chenopodiaceae)에 속하며, 어린 것을 나물 형태로 섭취하여 왔으며 서해안 갯벌 지역에 넓게 분포되어 있다(19). 칠면초는 항산화 활성과 B16BL6 cells에서 tyrosinase 활성 및 melanin 생성 억제력을 갖는다고 일부 보고된 바 있다(20,21). 또한 칠면초에 존재하는 성분으로는 glycinebetaine (betaine), 2'-hydroxy-6,7-methylenedioxyisoflavone, dehydrovomifoliol, 그리고 betacyanin류 등이 동정된 바 있다(21-23). 또한 본 연구팀은 칠면초로부터 항산화 활성 물질로 9종 flavonoid류, 3종의 phenylpropanoid류, 4종의 benzoic acid류, 그리고 pyrocatechol을 포함한 16종의 페놀성 화합물을 동정하여 보고한 바 있다(24).

석죽과에 속하는 또 다른 염생식물인 세발나물(*Spergularia marina* Griseb)은 서남해안의 간척지나 염전 주변에서 자생하는 식물로, 그 주변 지역에서는 봄나물 형태로 섭취하여 왔으나 그 외 지역에서는 그 존재 자체도 잘 알려져 있지 않다. 최근 세발나물이 겨울철 채소로 대량 재배되고 있고 그 소비량도 급증하고 있다. 그러나 전남지역에서 판매되고 있는 세발나물들을 대상으로 총페놀 함량 및 항산화 활성이 조사되어 보고되었을 뿐(25), 그의 유용성분 및 생리활성에 대한 연구는 칠면초에 비해 더욱 부족한 실정이다.

우리는 생리활성 및 기능성 성분이 우수한 염생식물을 발굴하여 유용 식품소재로 활용하고자, 서해안 지역에 자생하는 다양한 염생식물을 채취하여 항산화 활성 및 총페놀 함량을 조사한 바 있다. 이 중 칠면초와 세발나물을 포함한 많은 염생식물들은 항산화 활성이 우수하고 총페놀 함량도 높다는 사실을 확인하였다. 특히 칠면초는 서해안에 넓게 분포되어 있고 세발나물은 최근 겨울철 채소로 그 수요가 급증하고 있어, 두 염생식물은 새로운 채소작물이나 유용 식품소재로의 활용에 있어서 다른 염생식물에 비해 그 가능성이 더 높은 것으로 시사되었다.

칠면초분말(SJ)과 세발나물분말(SMG)에서 이미 밝혀진 항산화 활성과 밀접한 관계를 갖고 앞으로 식품소재로 이용 시 많은 도움이 될 인슐린 저항성 개선에 미치는 두 염생식물의 효과를 조사하였다. Cholecystokinin 1 (CCK-1) 수용체의 변이로 포만감을 느끼지 못해 성장하면서 인슐린 저항성과 제 2형 당뇨병을 나타내는 동물모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐를 사용하였으며(26), 인슐린 저항성이 생기기 전 시점인 생후 10주령부터 지속적으로 인슐린 저항성이 진행되는 28주령이 될 때까지 쥐에게 칠면초분말과 세발나물분말을 섭취시켜 인슐린 저항성에 관련된 인자들을 측정하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용한 칠면초는 2011년 10월에 전라남도 신안군에서 자생하고 있는 것을, 세발나물은 2012년 3월에 전라남도 무안군에서 재배된 것을 채취하였다. 시료를 채취한 즉시 물로 세척하여 갯벌과 이물질을 제거한 다음 동결건조한 후 분말화하여 시료로 사용하였다.

동물 실험

실험동물은 5주령의 male인 OLETF쥐를 오즈카사(Tokushima,

Japan)로부터 구입하였으며, 실험동물은 온도(20°C), 습도(50-60%) 및 주기의 조명(12시간 cycle)이 조절된 사육실에서 10주령이 될 때까지 사육하였다. 체중이 비슷한 10주령의 쥐들을 난괴법에 의해 3개의 실험군(n=8)로 나누었으며, AIN-93G를 기본 조성(27)으로 하여 3%(w/w)의 칠면초분말과 세발나물분말을 각각 첨가하여 제조된 사료를 28주령이 될 때까지 18주 동안 섭취시켰다. 이때 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 체중은 주 1회, 물과 식이 섭취량은 매일 측정하였다.

생화학적 인자 측정

혈당은 2주 간격으로 매 1회 12시간 절식시킨 다음 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당측정기(gDoctor, Green Cross, Anyang, Korea)를 이용하여 측정하였다. 인슐린은 채취된 혈액을 원심 분리하여 혈청 10 µL를 mouse insulin ELISA kit (TMB, Shibayagi, Japan)에 가하여 반응시킨 다음 450 nm와 620 nm로 설정된 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. Glycated hemoglobin (HbA1c, 당화혈색소)은 Nycocard kit (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway)을, 혈중 adiponectin 함량은 rat high molecular weight adiponectin ELISA kit (Shibayagi Co. Ltd., Shibayagi, Japan)를, 혈중 leptin 함량은 rat leptin ELISA kit (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL, USA)를 그리고 혈중 ghrelin 함량은 rat ghrelin ELISA kit (EZRGRT-91K, Millipore, Billerica, MA, USA)를 각각 이용하였다. 혈장에서 중성지방(triglyceride), 총콜레스테롤(total cholesterol), 그리고 고밀도지단백질콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol, HDL-cholesterol)의 함량은 효소법을 이용한 정량측정 kit (Asan Pharmaceutical, Hwaseong, Korea)를 이용하여 측정하였다.

경구 포도당 부하 내성 검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

포도당 내성 검사를 실시하기 전 12시간 동안 절식시킨 다음 5% 포도당(2 g/kg)을 경구투여한 후, 0, 30, 60, 120, 그리고 180분 간격으로 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 혈당은 혈당측정기(gDoctor)를 이용하여 측정하였다.

지질과산화물(thiobarbituric acid reactive substance) 함량 측정

혈액으로부터 분리한 혈장 100 µL를 20% trichloroacetic acid (TCA) 500 µL와 1 M thiobarbituric acid (TBA) 300 µL에 혼합한 다음 95°C에서 20분간 반응시켰다. 이후 방랭한 반응용액을 n-butanol 800 µL로 분배하고 원심 분리하여 malondialdehyde (MDA)-TBA 반응물이 함유된 n-butanol 층을 얻었다. 얻어진 n-butanol 층을 532 nm에서 흡광도를 측정하였고, MDA 표준용액으로 작성된 표준곡선을 이용하여 혈장에 함유된 MDA 함량을 구하였다(28).

희생 및 채혈 방법

실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 ethyl ether로 마취시켜 경추를 분리한 다음 개복하여 동물의 심장으로부터 직접 채혈하였다. 채혈된 혈액 샘플은 2% sodium citrate가 함유된 bottle에 넣고 3000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈장을 취하여 분석할 때까지 -80°C의 냉동고에 보관하였다. 또한 간, 근육, 지방, 신장 등의 조직들은 희생하여 채취한 다음 식염수로 세척하여 무게를 측정 후 바로 -80°C의 냉동고에 보관하였다.

Western blotting

각 조직 1g을 glass bottle에 넣고 1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium fluoride (NaF), 10 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/mL pepstatin, 1 µg/mL leupeptin, 10 mM Na₃VO₄, 그리고 0.1 mg/mL aprotinin으로 구성된 homogenized buffer 1 mL를 가한 다음 즉시 Polytron (PT1200E, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland)으로 균질화시킨 다음 4°C에서 2시간 동안 서서히 교반시켰다. 이 균질화 용액을 4°C에서 15000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 다음 상층액을 얻었다. 각 식이군의 단백질 함량은 Bradford 법(29)으로 측정하였다. 각 식이군의 단백질 용액(50 µg, 10 µL)에 tricine buffer 10 µL를 가하여 95°C에서 5분 동안 denaturation한 다음, 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 방법으로 분리하였다. 전개된 단백질을 polyvinylidene fluoride membrane에 이동시킨 다음, 이 membrane을 Tris buffer 용액으로 세척한 후 3% bovine serum albumin이 함유된 0.05% Tween-20 (TBST) buffer에서 1시간 동안 blocking하였다. 이어 TBST 용액으로 5분씩 3회 반복 세척한 membrane을 primary antibody인 serine phosphorylated anti-insulin receptor substrate 1 (pIRS1^{ser307})과 anti-nuclear factor-kappa B (NF-κB) p65 (polyclonal antibody, Upstate, Lake Placid, NY, USA) 용액에서 서서히 교반시키면서 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane을 TBST 용액으로 5분씩 3회 반복 세척한 다음, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G를 가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 세척된 membrane은 luminol이 함유된 enhanced chemiluminescence 용액과 반응시켜 필름에 현상하였다.

통계처리

본 실험의 자료는 Statistical Package for Social Sciences (IMB, Armonk, NY, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정(post-hoc)을 실시하였으며 분석 시 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하여 측정하였다.

결과 및 고찰

체중, 식이 섭취량 및 물 섭취량 변화

칠면초(SJ)와 세발나물(SMG)이 함유된 사료를 OLETF쥐에 섭취시키는 동안 체중 변화를 조사하였다. 대조군(CON)은 초기 10주령체 체중이 363.4 ± 12.6 g이었으며, 식이 종료 전 28주령체의 체중은 704.4 ± 26.9 g으로 지속적으로 증가하였다(Fig. 1A). OLETF 쥐는 약 30주령체까지 지속적으로 체중이 증가한다고 보고된 바 있어 그 결과(30)와 일치하였다. 칠면초분말과 세발나물분말을 섭취한 쥐들의 체중은 식이 18주 동안 대조군과 거의 유사하였으며, 각 식이군들 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 또한 식이섭취량 및 물섭취량은 두 염생식물을 섭취한 식이군들과 염생식물을 섭취하지 않은 식이군 모두 유의적 차이를 보이지 않았다(data 생략).

공복 혈당 변화

칠면초와 세발나물을 OLETF쥐에 18주간 급여하는 동안 공복 혈당 변화를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 1B에 나타났다. 본 실험에서도 대조군의 공복혈당은 염생식물을 급여하기 직전 10주령부터 염생식물을 급여 종료 시점인 28주령까지 크게 증가하지 않았으나 전반적으로 증가하는 경향을 나타냈으며, 이는 OLETF

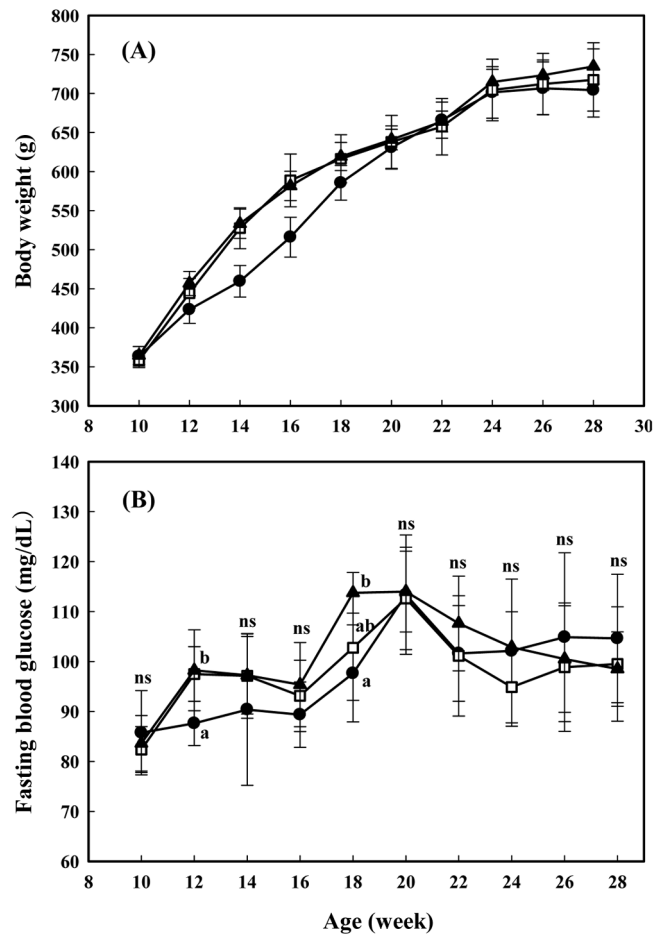


Fig. 1. Changes of body weight (A) and blood glucose level (B) in rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. ●, control group; □, *S. japonica* (SJ) group; ▲, *S. marina* Griseb (SMG) group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD ($n=8$). ^{a,b}Values with different superscripts in the same age are significantly different among the diet groups at $p < 0.05$. ^{ns}No significant difference.

쥐가 성장하면서 약 30주령체까지 공복 혈당이 증가한다는 보고(30)와 유사하였다. 본 실험에서 OLETF쥐는 28주령체가 될 때까지 지속적으로 증가한 것으로 보아, 이 쥐는 인슐린 저항성이 생긴 것으로 사료되었다. 그러나 두 염생식물을 급여하는 동안 쥐의 공복 혈당 변화는 대조군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 두 염생식물 급여는 인슐린 저항성으로 인해 서서히 증가하는 OLETF쥐의 고혈당 수치를 줄여주지 못한 것으로 시사되었다.

포도당 내성

칠면초와 세발나물을 18주 동안 섭취시킨 OLETF쥐(28주령)들을 대상으로 포도당 부하 내성 검사를 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 염생식물을 급여하지 않은 대조군은 포도당을 투여한 후 혈당 농도는 60 min에 정점을 보인 후 점진적으로 감소하였으며, 포도당을 투여한 후 180 min에는 포도당 투여 전 공복 혈당 수치와 거의 유사한 수준을 나타냈다(Fig. 2A). 두 염생식물을 급여한 식이군들은 대조군과 거의 유사한 양상을 보였으나, 포도당 투여 60 min에는 대조군에 비해 유의적으로 낮은 공복 혈당을 나타냈다($p < 0.05$). 포도당을 투여한 후의 혈당 변화에

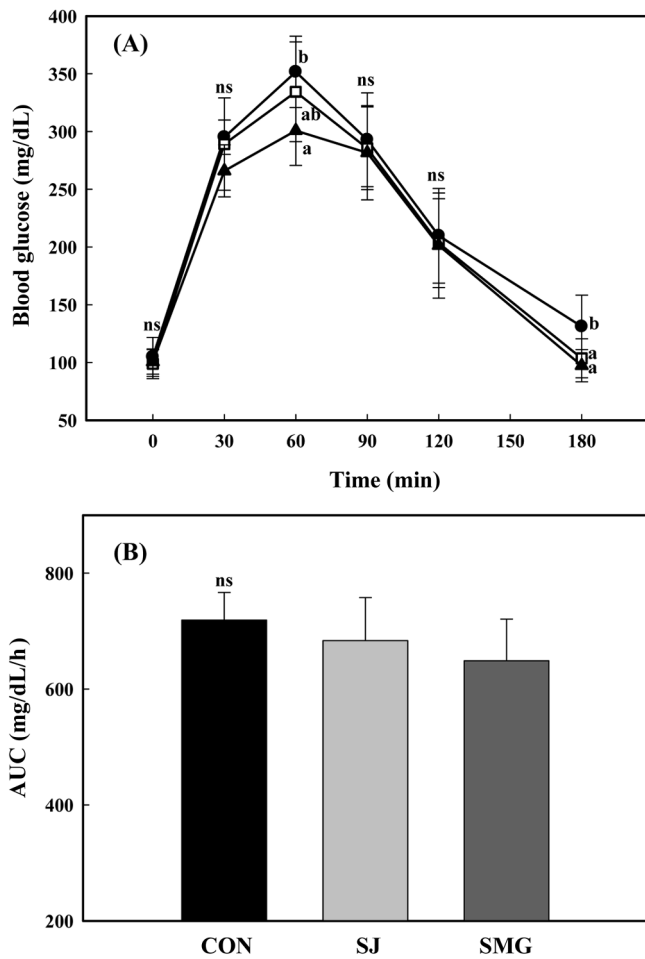


Fig. 2. Oral glucose tolerance test (A) and its area under curve value (B) in rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. ●, control group; □, *S. japonica* (SJ) group; ▲, *S. marina* Griseb (SMG) group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD (n=8). ^{a,b}Values with different superscripts in the same time after injection of glucose are significantly different among the diet groups at *p*<0.05. ^{ns}No significant difference.

대한 혈당 면적(area under curve, AUC)을 산출한 결과에서는 세발나물과 칠면초식이군들이 대조군에 비해 낮은 경향을 보였으나 각 식이군들 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2B). 세발나물이나 칠면초 섭취가 인슐린 저항성으로부터 오는 당내성의 감소를 개선하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

혈중 HbA1c과 Insulin 함량

당화혈색소(HbA1c)는 포도당과 hemoglobin이 결합한 형태로, 혈당 함량이 높을 경우 그 함량도 높다고 보고된 바 있다(31). 특히 당화혈색소 수치는 검사 시점 전 2-3개월 동안의 혈당 상태를 알 수 있으므로, 당뇨병 등 대사증후군을 예견하는데 그 지표 인자로 널리 이용되고 있다(32). 그래서 두 염생식물을 18주 동안 급여한 OLETF쥐(28주령)의 전혈에서 HbA1c 농도를 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 3A에 나타냈다. 혈중 HbA1c 함량은 대조군이 7.21±0.81%으로 가장 높았으며, Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐(4.0±0.40%)에 비해 약 3.2% 이상 높은 수치를 나타냈다. 두 염생식물식이군들은 대조군에 비해 낮은 HbA1c 수치를 나타냈다. 세발나물식이군(SMG, 6.00±0.75%)은 대조군과 유

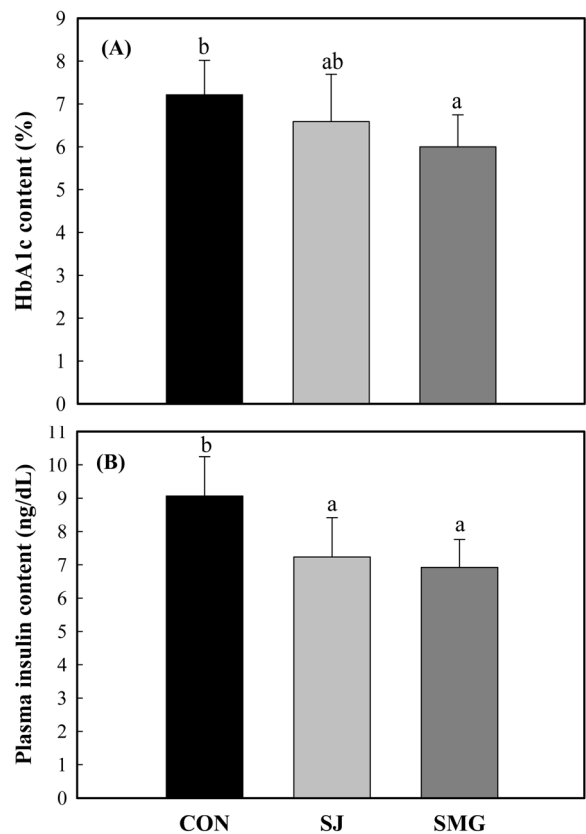


Fig. 3. Blood HbA1c (A) and insulin (B) levels in rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. Con, control group; SJ, *S. japonica* group; SMG, *S. marina* Griseb group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD (n=8). ^{a,b}Values with different superscripts are significantly different among the diet groups at *p*<0.05.

의적인 차이를 보였던 반면, 칠면초식이군(SJ, 6.59±1.11%)은 대조군과 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 또한 세발나물식이군이 칠면초식이군에 비해 낮은 HbA1c 함량을 나타냈으나 두 식이군 간의 유의차는 보이지 않았다. 칠면초와 세발나물을 섭취한 두 식이군의 HbA1c 수치는 대조군에 비해 낮았던 것으로 보아 두 염생식물 섭취가 HbA1c 생성을 줄여 준 것으로 시사되었으며, 세발나물의 효과가 더 현저하였다.

염생식물을 18주 동안 급여한 OLETF쥐(28주령)의 혈장에서 insulin 농도를 조사하였다(Fig. 3B). 혈중 insulin 농도는 대조군이 9.06±1.18 ng/dL으로 가장 높게 나타났다. 칠면초식이군은 7.23±1.18 ng/dL, 세발나물식이군은 6.92±0.84 ng/dL로 대조군에 비해 유의적으로 낮은 insulin 함량을 나타냈다. 인슐린 저항성이 심해질 경우 일반적으로 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)을 동반한다고 알려져 있다(33). OLETF쥐의 경우 생후 약 30주령까지 혈중 insulin 농도가 지속적으로 증가하다가 그 이후 그 농도가 감소한다고 보고된 바 있다(34). 그러므로 28주령인 OLETF쥐에서 염생식물을 섭취하지 않은 대조군의 혈중 insulin 수치가 염생식물을 섭취한 두 식이군보다 높았던 것으로 보아, 대조군은 고인슐린혈증이 생긴 것으로 여겨진다. 칠면초와 세발나물을 섭취한 두 군의 insulin 수치는 대조군에 비해 낮았던 점을 고려해 볼 때 두 염생식물 섭취가 고인슐린혈증을 줄여 준 것으로 시사되었으며, 세발나물이 더 현저하였다.

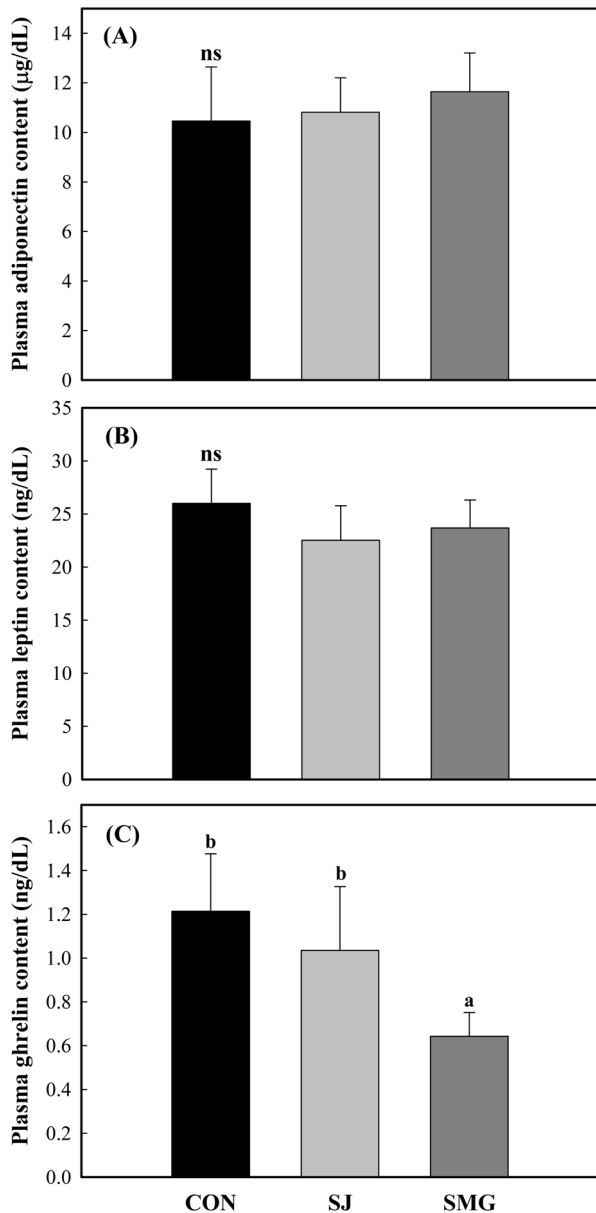


Fig. 4. Blood adiponectin (A), leptin (B), and ghrelin (C) levels in rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. Con, control group; SJ, *S. japonica* group; SMG, *S. marina* Griseb group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD ($n=8$). ^{ab}Values with different superscripts are significantly different among the diet groups at $p<0.05$. ^{ns}No significant difference.

혈중 adiponectin, leptin 및 ghrelin 함량

Adiponectin은 지방세포에서 분비되는 adipocytokine으로, 에너지 대사에 관여하는 인자로 알려져 있다(35). 그래서 본 실험에서는 염생식물 섭취가 인슐린 저항성이 진행되고 있는 OLETF쥐에서 adiponectin 수치에 영향을 주는지 알아보고자, 두 염생식물을 섭취시킨 OLETF쥐(28주령)의 혈장에서 adiponectin 농도를 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 4A에 나타냈다. Adiponectin 농도는 두 염생식물을 섭취시킨 식이군들과 대조군 간에 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 그러나 두 염생식물식이군이 대조군에 비해 상대적으로 높은 adiponectin 수치를 나타냈으며, 세발나물식이군이 칠면초식이군보다 더 현저하였다. Adiponectin 수치는 정상인에 비해 비만, 인슐린 저항성, 그리고 제2형 당뇨병 환자에서 감소한다고 보고된 바 있다(36,37). 따라서 두 염생식물 섭취가 인슐린 저항성이 진행되더라도 adiponectin 분비에 긍정적인 영향을 준 것으로 여겨지나 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.

Leptin은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로, 식욕을 억제시키고 에너지 소비를 높여 체중 조절에 관여하는 인자로 밝혀지고 있다. 비만인 경우 leptin 농도가 이미 높아져 있어 leptin을 투여하더라도 반응하지 않는 leptin resistance가 발생되고 인슐린저항성과 당뇨병을 유발할 수 있다고 보고된 바 있다(38,39). 그래서 본 실험에서는 생후 성장하면서 비만과 함께 hyperleptinemia를 나타내는 OLETF쥐에 염생식물을 18주 동안 급여한 다음 leptin 농도에 영향을 주는지 조사하였다. 염생식물을 급여하지 않은 OLETF쥐의 혈중 leptin 농도는 26.0 ± 3.22 ng/dL로, LETO쥐(11.7 ± 2.0 ng/dL)에 비해 약 2.2배 높게 나타났으며(Fig. 4B), 이는 선행연구(34)에서 보고된 결과와 유사하였다. 그러므로 염생식물을 급여하지 않은 OLETF쥐는 hyperleptinemia가 이미 유발된 것으로 해석되었다. 두 염생식물을 급여한 OLETF쥐의 혈중 leptin 농도는 염생식물을 급여하지 않은 대조군에 비해 더 낮았으며, 세발나물식이군이 칠면초식이군보다 더 현저하였다. 따라서 두 염생식물 섭취가 OLETF쥐의 hyperleptinemia를 줄여 준 것으로 시사되었다. 그러나 염생식물을 섭취시킨 두 식이군들과 대조군 간에 leptin 수치는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다.

Ghrelin은 주로 위 점막에서 분비되는 hormone으로, 비만과 인슐린 저항성과 연관이 있다고 알려져 있다(40). 본 실험에서는 생후 성장하면서 비만이 생기는 OLETF쥐에 염생식물을 18주 동안 급여한 다음 혈중 ghrelin 농도를 조사하였다. 염생식물을 급여하지 않은 OLETF쥐의 혈중 ghrelin 농도는 1.21 ± 0.26 ng/dL로 나타났다(Fig. 4C). 칠면초식이군은 1.04 ± 0.29 ng/dL, 세발나물식이군은 0.64 ± 0.11 ng/dL로 대조군에 비해 유의적으로 낮은 ghrelin 농도를 나타냈다. 최근 streptozotocin으로 유발시킨 당뇨 쥐에서 ghrelin 농도가 증가하고 고혈당증과 함께 현저한 과식증을 유발할 수 있다고 보고된 바 있다(41). 비만과 함께 인슐린저항성을

Table 1. Blood triglyceride and cholesterol levels in rats fed diets containing halophytes for 18 weeks

Groups	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	High density lipoprotein-cholesterol (mg/dL)
CON	298.2 ± 34.2^b	172.4 ± 24.1^b	78.4 ± 15.4^{ns}
SJ	248.8 ± 43.4^{ab}	163.6 ± 23.8^{ab}	80.0 ± 15.5
SMG	201.4 ± 35.6^a	137.9 ± 13.4^a	73.8 ± 10.6

CON, control group; SJ, *Suaeda japonica* group; SMG, *Spergularia marina* Griseb group. Values are expressed as mean±standard deviation ($n=8$). OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks.

^{ab}Values with different superscripts in the same column are significantly different among the diet groups at $p<0.05$.

^{ns}No significant difference.

나타내는 OLETF쥐에게 칠면초와 세발나물을 섭취시킨 두 식이군 모두 혈중 ghrelin 농도가 대조군에 비해 더 낮았던 점을 고려해 볼 때, 두 염생식물 섭취가 ghrelin 생성을 줄여 준 것으로 시사되었으며, 세발나물의 효과가 칠면초보다 더 현저하였다.

혈중 중성지질 및 콜레스테롤 함량

염생식물을 18주 동안 섭취한 OLETF쥐(28주령)의 혈장에서 중성지질 및 cholesterol 함량을 조사하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타냈다. 염생식물을 섭취하지 않은 대조군인 OLETF쥐의 혈중 중성지질 농도는 298.2±43.2 mg/dL로, LETO쥐(107.4±27.9 mg/dL)에 비해 압도적으로 높게 나타났다. 칠면초를 섭취한 OLETF쥐의 혈중 중성지질농도는 248.8±43.5 mg/dL으로 대조군에 비해 낮게 나타났으나 두 식이군들 간의 유의차는 보이지 않았다. 흥미롭게도, 세발나물을 섭취한 OLETF쥐(201.5±35.6 mg/dL)는 대조군에 비해 현저하게 낮은 혈중 중성지질농도를 나타냈다($p<0.05$). 혈중 cholesterol 농도의 경우 염생식물을 섭취하지 않은 대조군인 OLETF쥐(172.4±24.3 mg/dL)가 LETO쥐(123.5±13.2 mg/dL)에 비해 매우 높은 수치를 나타냈다. 칠면초를 섭취한 OLETF쥐들(163.6±23.8 mg/dL)은 대조군에 비해 낮은 총 cholesterol 수치를 나타냈으나 두 식이군들 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 세발나물식이군(137.9±13.4 mg/dL)은 대조군과 칠면초식이군에 비해 현저하게 낮게 측정되었다. 그러나 HDL-cholesterol 함량은 식이군들 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 인슐린 저항성이 심해질 경우 hepatic lipase의 활성이 증가하고 혈중 총콜레스테롤과 중성지질 농도가 높아진다고 보고된 바 있다(42,43). 따라서 본 실험에서 두 염생식물을 섭취한 OLETF쥐의 혈중 콜레스테롤과 중성지질 농도는 염생식물을 섭취하지 않은 대조군보다 낮은 함량을 보였을 뿐만 아니라 adiponectin과 양의 상관관계를 나타냈다. 그러므로 두 염생식물 특히 세발나물은 인슐린 저항성이 진행됨에 따라 증가되는 총 cholesterol 및 중성지질을 줄여주는 데 긍정적인 영향을 주는 것으로 해석되었다.

혈중 지질과산화물 함량

체내 과도한 산화스트레스는 인슐린저항성 및 제 2형 당뇨병과 연관된다고 보고되고 있다(44). 혈중 지질과산화물 함량은 체내 지질의 최종산화물로, 산화스트레스 정도를 알 수 있는 주요 지표 인자로 알려져 있다(45). 그래서 염생식물을 18주 동안 섭취한 OLETF쥐(28주령)의 혈장을 대상으로 지질과산화물 함량을 조사하여 염생식물의 섭취가 산화스트레스(oxidative stress)에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과(Fig. 5), 혈중 지질과산화물 함량(MDA)은 염생식물을 섭취하지 않은 대조군인 OLETF쥐가 6.9±0.5 mg/dL로, LETO쥐(5.6±0.8 mg/dL)에 비해 높은 수치를 나타냈다. OLETF쥐는 비만과 함께 인슐린저항성이 심해져 산화스트레스가 증가한 것으로 해석되었다. 반면에 두 염생식물을 섭취한 OLETF쥐들은 염생식물을 섭취하지 않은 OLETF쥐에 비해 낮은 수치를 나타냈으며, 세발나물을 섭취한 OLETF쥐(6.1±0.7 mg/dL)는 칠면초를 섭취한 OLETF쥐(6.4±0.7 mg/dL)에 비해 더 낮은 혈중 지질과산화물 수치를 나타냈다. 그러나 두 염생식물을 섭취한 식이군과 염생식물을 섭취하지 않은 식이군 간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

지방조직에서의 NF-κB 발현량 비교

NF-κB는 tumor necrosis factor-α 경로에서 발현하는 인자로, 염증 및 세포괴사 및 인슐린 신호 전달에도 부정적인 영향을 준다고 알려져 있다(46). 두 염생식물을 18주 동안 섭취한 OLETF쥐

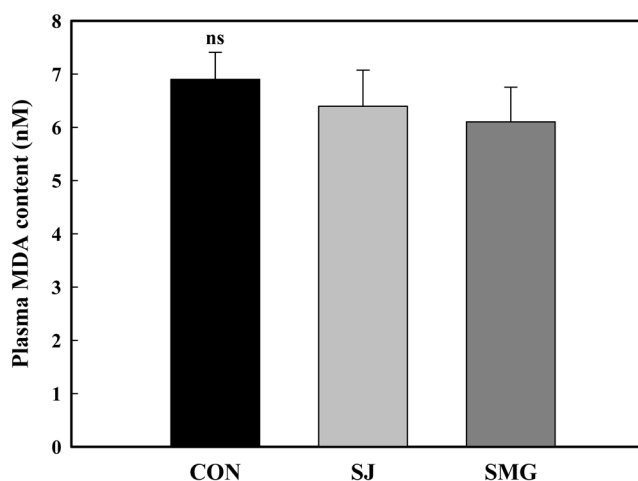


Fig. 5. Blood MDA levels in rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. Con, control group; SJ, *S. japonica* group; SMG, *S. marina* Griseb group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD (n=8). ^{ns}No significant difference.

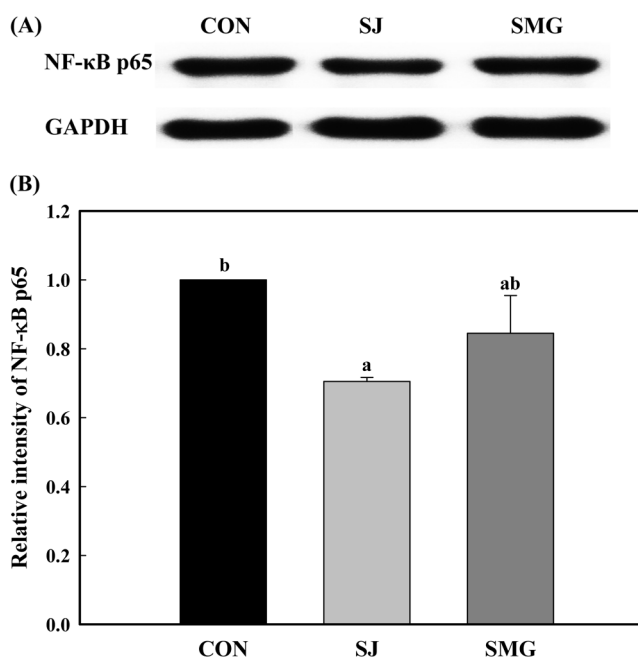


Fig. 6. Western blotting (A) and relative density (B) of NF-κB p65 in adipose tissue of rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. Con, control group; SJ, *S. japonica* group; SMG, *S. marina* Griseb group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD (n=8). ^{a,b}Values with different superscripts are significantly different among the diet groups at $p<0.05$.

(28주령)의 지방조직을 대상으로 NF-κB p65 발현량을 조사하였다. 혈중 지질과산화물 수치의 경우 두 염생식물을 섭취한 식이군과 염생식물을 섭취하지 않은 대조군 간에 현저한 차이는 관찰되지 않았으나(Fig. 5), 지방조직에서의 NF-κB p65 발현량은 식이군들 간의 유의적인 차이를 나타냈다(Fig. 6). 즉 칠면초를 섭취한 OLETF쥐는 염생식물을 섭취하지 않은 OLETF쥐에 비해 유의적으로 낮은 NF-κB p65 발현량을 보였다. 세발나물을 섭취한

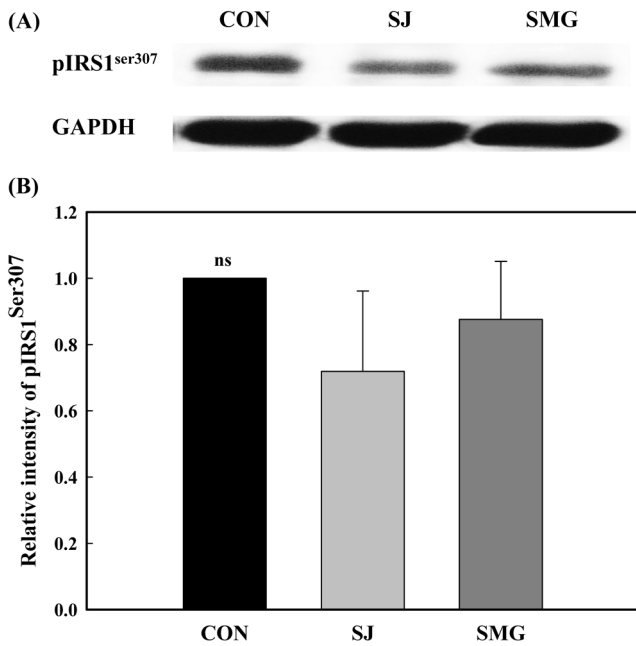


Fig. 7. Western blotting (A) and relative density (B) of pIRS1^{Ser307} in skeletal muscle of rats fed diets containing halophytes for 18 weeks. Con, control group; SJ, *S. japonica* group; SMG, *S. marina* Griseb group. OLETF rats (10 week-old) were fed diets containing 3% (w/w) halophytes for 18 weeks. Values are expressed as mean±SD ($n=8$). ^{ns}No significant difference.

OLETF쥐의 NF-κB p65 발현량은 염생식물을 섭취하지 않은 OLETF쥐에 비해 더 낮았으며, 칠면초를 섭취한 OLETF쥐에 비해 더 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 세발나물이나 칠면초 섭취는 OLETF쥐가 인슐린 저항성이 진행되면서 오는 산화 스트레스를 줄여주는데 효과가 있는 것으로 시사되었다.

근육조직에서의 pIRS1^{Ser307} 발현량 비교

NF-κB 발현량의 증가는 인슐린 신호전달에 관여하는 insulin receptor substrate-1(IRS-1)의 인산화를 유도하여 IRS-1의 기능을 떨어뜨려 인슐린 신호전달을 저해함으로써 인슐린 저항성을 유발시킨다고 잘 알려져 있다(47). 특히 IRS-1의 307번 아미노산 serine이 인산화된 변형 단백질인 pIRS1^{Ser307}은 인슐린 신호전달에 있어서 부정적(negative) 조절 인자로, 인슐린 저항성의 진행 정도를 파악하는데 지표 인자로 이용되고 있다(48). 그래서 두 염생식물을 18주 동안 섭취한 OLETF쥐(28주령)의 근육조직을 대상으로 pIRS1^{Ser307} 발현량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 7), 두 염생식물을 섭취한 OLETF쥐의 근육조직에서 pIRS1^{Ser307} 발현량은 염생식물을 섭취하지 않은 대조군에 비해 더 낮게 나타났다. 칠면초를 섭취한 OLETF쥐는 세발나물을 섭취한 OLETF쥐에 비해 더 낮은 발현량을 보였다. 그러므로 칠면초와 세발나물은 인슐린 신호전달에 있어서 부정적인 조절 인자인 pIRS1^{Ser307} 발현량을 줄여주는 것으로 시사되었으나 각 식이군 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

요 약

본 연구에서는 염생식물인 칠면초와 세발나물의 인슐린 저항

성을 개선하는 효과를 조사하였다. 본 실험에 사용한 OLETF쥐는 CCK-1 수용체의 결함으로 인해 인슐린 저항성을 걸쳐 제 2형 당뇨병이 유발되는데, 인슐린 저항성이 진행되는 10주령부터 28주령이 될 때까지 칠면초와 세발나물을 18주 동안 섭취시켰다. 염생식물식이군들의 체중이나 공복혈당 변화는 식이기간 동안 전반적으로 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. Oral glucose tolerance test에서 염생식물 섭취가 당 내성을 개선하는 효과를 보였으나 그 혈당 변화를 면적으로 환산하였을 때 각 식이군들 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 혈중 insulin 및 HbA1c 수치는 유의하게 낮은 수치를 보였으며, adiponectin 수치는 높고 leptin과 ghrelin 수치는 낮았으나 현저한 차이는 관찰되지 않았다. 세발나물식이군의 혈중 중성지방과 총 cholesterol 수치는 대조군에 비해 유의적으로 더 낮았다. 혈중 지질산화물 함량은 각 식이군 간 유의차가 관찰되지 않았으나 염생식물식이군에서 더 낮은 경향을 보였으며, NF-κB p65는 지방조직에서 유의적으로 낮은 발현량을 보였다. 또한 두 염생식물식이군에서 인슐린 신호전달의 negative regulator인 pIRS1^{Ser307}의 발현량은 대조군에 비해 더 낮음을 확인하였다. 그러므로 칠면초와 세발나물은 생후 성장하면서 인슐린 저항성이 생기는 OLETF쥐의 인슐린 저항성을 현저하게 줄여주지는 못하였으나 그 개선 효과는 있는 것으로 시사되며, 두 염생식물의 급여 기간을 늘려 제 2형 당뇨병을 예방하는 효과에 대한 상세한 검토가 보완되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ0093660 22013)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다. 또한 공동저자 배동근의 안식년 기간 중에 연구되었습니다.

References

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33: S62-S69 (2010)
- Eyre H, Kahn R, Robertson RM. Preventing cancer, cardiovascular diseases, and diabetes. *Diabetes Care* 27: 1812-1824 (2004)
- Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* 1: 68-75 (2010)
- Gougeon R. Insulin resistance of protein metabolism in type 2 diabetes and impact on dietary needs: A review. *Can. J. Diabetes* 37: 115-120 (2013)
- Cuerda C, Luengo LM, Valero MA, Vidal A, Burgos R, Calvo FL, Martínez C. Antioxidants and diabetes mellitus: Review of the evidence. *Nutr. Hosp.* 26: 68-78 (2011)
- Kim SS, Son SM. Oxidative stress and cell dysfunction in diabetes: Role of ROS produced by mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Korean Diabetes J.* 32: 389-398 (2008)
- Singh RB, Choudhury J, Meester FD, Wilson DW. Development of the Mediterranean soup for enteral nutrition and for prevention of cardiovascular diseases. *Open Nutraceut. J.* 5: 90-98 (2012)
- Lokhande VH, Suprasanna P. Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. pp. 29-56. In: *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change.* Parvaiz A, Prasad, MNV. (eds.). Springer, New York (2012)
- Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 60: 324-349 (2005)
- Ksouri R, Ksouri WM, Jallali I, Debez A, Magne C, Hiroko I, Abdelly C. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32: 289-326 (2012)
- Lee HJ, Kim YA, Ahn JW, Lee BJ, Moon SG, Seo YW. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 57-61 (2004)

12. Lee BM, Shim SI, Lee SK, Kang BH, Chung IM, Kim KH. Physiological response on saline tolerance between halophytes and glycophytes. *Korean J. Environ. Agr.* 18: 61-65 (1999)
13. Lee YS, Lee SH, Kim BK, Oguchi K, Shin KH. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 916-918 (2005)
14. Ha JA, Lee SH, Kim HJ, Lee JY. The role of *Salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1305-1309 (2006)
15. Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam YW. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. *Toxicol. in Vitro* 22: 1742-1748 (2008)
16. Park SH, Kim KS. Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 120-123 (2004)
17. Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH, Jeong HG. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. *Arch. Pharm. Res.* 28: 1122-1126 (2005)
18. Kim JY, Cho JY, Ma YK, Park KY, Lee SH, Ham KS, Lee HJ, Park KH, Moon JH. Dicafeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity. *Food Chem.* 125: 55-62 (2011)
19. Kim JA, Choo YS, Lee IJ, Bae JJ, Kim IS, Choo BH, Song SD. Adaptations and physiological characteristics of three Chenopodiaceae species under saline environments. *Korean J. Ecol.* 25: 101-107 (2002)
20. Choi JI, Kim YJ, Kim JH, Song BS, Yoon Y, Byun MW, Kwon JH, Chun SS, Lee JW. Antioxidant activities of the extract fractions from *Suaeda japonica*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 131-135 (2009)
21. Kim JH, Song JY, Lee JM, Oh SH, Lee HJ, Choi HJ, Go JM, Kim YH. A study on physicochemical property of *Salicornia herbacea* & *Suaeda japonica*. *J. Fd. Hyg. Safety* 25: 170-179 (2010)
22. Kim JS, Lee SH, Son EM, Pan X, Kim YA, Lee GS, Seo YW, Lee BJ. Phytochemical constituents of *Suaeda japonica* Makino. *J. Crop Sci.* 50: 208-210 (2005)
23. Hayakawa K, Agarie S. Physiological roles of betacyanin in a halophyte, *Suaeda japonica* Makino. *Plant Prod. Sci.* 13: 351-359 (2010)
24. Cho JY, Yang X, Park KH, Park HJ, Park SY, Moon JH, Ham KS. Isolation and identification of antioxidative compounds from *Suaeda japonica* and their antioxidative activities. *Food Sci. Biotechnol.* 22: 1547-1557 (2013)
25. Heo BK, Park YJ, Park YS, Im MH, Oh KT, Cho JY. Distribution status, physicochemical composition, and physiological activity of *Spergularia marina* cultivated in the western region in Jeon-Ra-Nam-Do. *Korean J. Commun. Living Sci.* 20: 181-191 (2009)
26. Hajnal A, Covasa M, Bello NT. Altered taste sensitivity in obese, prediabetic OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R1675-R1686 (2005)
27. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey FC 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.* 123: 1939-1951 (1993)
28. Ledwozyw A, Michalak J, Stepian A, Kadziolka A. The relationship between plasma TG, cholesterol, total lipid peroxidation product during human atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 155: 272-284 (1986)
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 284-254 (1976)
30. Hong EG, Noh HL, Lee SK, Chung YS, Lee KW, Kim HM. Insulin and glucagon secretions, and morphological change of pancreatic islets in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *J. Korean Med. Sci.* 17: 34-40 (2002)
31. Lind M, Odén A, Fahlén M, Eliasson B. A systematic review of HbA1c variables used in the study of diabetic complications. *Diabetes Metabol. Syndr.: Clin. Res. Rev.* 2: 282-293 (2008)
32. Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 47: 1157-1165 (2001)
33. Muoio DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Mol. Cell Biol.* 9: 193-205 (2008)
34. Hossain MA, Kitagaki S, Nakano D, Nishiyama A, Funamoto Y, Matsunaga T, Tsukamoto I, Yamaguchi F, Kamitori K, Dong Y, Hirata Y, Murao K, Toyoda Y, Tokuda M. Rare sugar D-psicose improves insulin sensitivity and glucose tolerance in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405: 7-12 (2011)
35. Sheng TX, Yang KJ. Adiponectin and its association with insulin resistance and type 2 diabetes. *J. Genet. Genomics* 35: 321-326 (2008)
36. Satoh N, Naruse M, Usui T, Tagami T, Suganami T, Yamada K, Kuzuya H, Shimatsu A, Ogawa Y. Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27: 2488-2490 (2004)
37. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1930-1935 (2001)
38. Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG. Leptin receptor action and mechanism of leptin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 642-652 (2005)
39. Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Ann. Rev. Physiol.* 70: 537-556 (2008)
40. Tomomi M, Masamistu N, Masanari M, Yakari D, Muhtashan SM, Muneki T, Nozoe S, Hsoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 240-244 (2002)
41. Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinol.* 143: 4934-4934 (2002)
42. Borggrev SE, De Vries R, Dullaart RPF. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur. J. Clin. Invest.* 33: 1051-1069 (2003)
43. Ginberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch. Med. Res.* 36: 232-240 (2005)
44. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.* 50: 567-575 (2011)
45. Mizuno T, Matsui H, Imamura A, Numaguchi Y, Sakai K, Murohara T, Okumura K. Insulin resistance increases circulating malondialdehyde-modified LDL and impairs endothel. *Int. J. Cardiol.* 97: 455-461 (2004)
46. Rial NS, Choi K, Ngugen T, Snyder B, Slepian MJ. Nuclear factor kappa B (NF- κ B): A novel cause for diabetes, coronary artery disease and cancer initiation and promotion? *Med. Hypotheses* 78: 29-32 (2012)
47. Danielsson A, Fredrik HN, Stralfors P. Phosphorylation of IRS1 at serine 307 and serine 312 in response to insulin in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 1183-1187 (2006)
48. Hilder TL, Janet CL. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 553: 63-67 (2003)