

매생이 추출물 첨가 통밀 쿠키의 마우스 혈당 항상성 개선 효과

임재민¹ · 전수현² · 정유진¹ · 이광원^{1,*}

¹고려대학교 일반대학원 생명공학과, ²고려대학교 식품생의학안전연구소

Improvement of blood glucose homeostasis in mice fed with *Capsosiphon fulvescens* extract-added whole wheat cookie

Jae-Min Lim¹, Su-Hyun Chun², Yu-Jin Jeong¹, and Kwang-Won Lee^{1,*}

¹Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

²Institute of Biomedical Science and Food Safety, Korea University

Abstract The present study aimed to investigate the effect of whole wheat cookie supplemented with *Capsosiphon fulvescens* (CF) extract on serum glucose homeostasis in C57BL/6 mice. This study examined whether the same effect was demonstrated for whole wheat cookie in comparison to previous research documenting the glucose-lowering effect of food products combined with CF extract. Mice were divided into three groups depending on the diet administered: normal cookie (NC), whole wheat cookie (WC), and WC blended with CF extract (WCFE). After 4 weeks of administering the experimental diet, the blood glucose level, serum insulin level, and homeostatic model assessment for insulin resistance index were found to be significantly lower in the WCFE group than in the NC and WC groups. These results suggest that whole wheat cookie containing CF extract is effective in preventing insulin resistance and maintaining blood glucose homeostasis.

Keywords: blood glucose, *Capsosiphon fulvescens*, insulin resistance, homeostasis, whole wheat cookie, health foods

서 론

식생활의 서구화와 생활환경의 변화로 인해 현대인의 대사 질환의 발병률이 높아지고, 그 결과 지난 수십년 동안 당뇨 및 대사 질환의 유병률은 지속적인 증가세를 보이고 있다(Bae, 2016). 국제 당뇨병재단에 따르면 전세계적으로 당뇨의 유병률은 2017년 기준 20-79세의 성인 인구 중 4.25억 명에서 2019년 기준 4.63억 명으로 증가하였으며, 이는 2045년에는 51%가 증가한 7억 명이 될 것으로 추정된다(Rhee, 2020). 대부분의 당뇨병 환자에 해당하는 제2형 당뇨병은 간, 근육, 지방조직에서의 혈당 대사의 이상으로 발생한 인슐린 저항성으로 인해 인슐린 작용이 충분하지 못하여 발생된다(Grover 등, 2002). 당뇨병 환자들은 높은 혈당 수준을 가지므로 인슐린의 분비가 증가되나, 인슐린 민감도가 낮아 포도당이 조직 내로 흡수되는 것을 방해하여 고혈당 상태가 유지된다(Guillausseau 등, 2008). 따라서 당뇨병을 개선하기 위해서는 식후 체내로 흡수된 포도당이 혈액에서 주변 조직으로 빠르게 흡수되도록 하는 것이 중요하다(Kim 등, 1996). 식품으로부터 섭취된 포도당은 주로 근육, 지방, 간 조직에서 사용되며, 특히 간은 포도당의 소비 뿐 만 아니라 포도당의 생성에도 관여하

여 혈당 대사에 중요한 역할을 한다(Adeva Andany MM 등, 2016). 간과 근육 조직에서의 포도당 이용률을 높이려면 포도당 수송체 단백질인 glucose transporter (GLUT) 2와 GLUT4를 활성화시켜 간과 근육 조직으로의 포도당 흡수율을 높여야 하며, 이는 운동과 올바른 식단을 병행하거나 혈당강하제를 복용하는 것을 통해 혈당 관리를 할 수 있다(Mueckler과 Thorens, 2013). 이에 대해 연구자들은 부작용이 발생할 수도 있는 합성 의약품 대신 안전성이 검증된 천연물로부터 혈당 강하 소재를 개발하기 위한 연구와 이들 생리활성성분을 기반으로 하여 기능성 식품을 개발하려는 연구를 진행하고 있다(Hu 등, 2018; Park, 2020).

매생이(*Capsosiphon fulvescens*)는 다양한 영양성분이 함유된 해조류로 칼슘, 칼륨, 철분, 셀레늄과 같은 무기질과 비타민 A, C 및 오메가-3 계열의 지방산도 다량 함유하고 있어 영양학적으로 다른 해조류보다 우수하다고 알려져 있다(Hwang 등, 2008). 매생이의 생리적 효능으로는 무기질로 골다공증 예방(칼슘), 조혈기능 조절(철분), 혈압강하(칼륨) 등이 있으며, 중성지방과 콜레스테롤 저하, 항당뇨, 항고혈압 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Jung 등, 2005; Kwon과 Nam, 2006). 그리고 Cho 등(2011)에 의하면 매생이 에탄올 추출물의 α -glucosidase 저해 효과가 있어 매생이 에탄올 추출물의 항당뇨 효과가 있다고 보고하였다(Cho 등, 2011). 본 연구진의 선행연구 결과에서 Hong 등(2016)은 매생이로부터 추출된 pheophorbide A를 이용하여 당화 반응을 억제함으로써 당뇨 합병증을 일으키는 병리학적 과정의 주요 요소인 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)의 생성을 저해하면서 당뇨 합병증에 대한 예방 효과를 연구한바 있다. 또한 선행연구에 따르면, 매생이 추출물이 첨가된 일반 식빵 및 통밀 식빵을 섭취한 동물실험에서 매생이 추출물의 혈당강하 효

*Corresponding author: Kwang-Won Lee, Department of Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea
Tel: +82-2-3290-3027
Fax: +82-2-927-1970
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Received March 22, 2021; revised May 18, 2021;
accepted May 21, 2021

과를 확인하였다(Han 등, 2016; Kim 등, 2016). 통곡물은 정제된 곡물과 비교했을 때 당 지수(glycemic index, GI)가 낮아 섭취 시 혈당의 상승 속도가 느려 혈당관리에 좋고 더불어 혈중 콜레스테롤을 낮춰주어 동맥경화 및 고콜레스테롤혈증의 위험을 줄여준다(McKeown 등, 2002). '미국의사협회 내과학회지'에 게재된 연구결과에 따르면, 매일 통곡물 28 g을 먹을 경우 심혈관계 질환의 질환을 낮추어 심장병과 당뇨병의 예방에 도움이 되는 것으로 알려져 있다(Wu 등, 2015).

쿠키는 모든 연령층에서 많이 섭취하는 간식으로 대부분의 쿠키는 수분함량이 10% 미만으로 미생물 생장이 어려워 저장성이 높으며 혼합된 반죽을 구워내는 방식으로 부재료 첨가에도 용이한 장점을 가지고 있다(Kim 등, 2002; Kim 등, 2013). 그러나 일반적인 쿠키는 빵에 비해 전분 및 당의 함량이 높아 지속적인 섭취 시 당뇨 환자 뿐 만 아니라 정상인에게도 높은 수준의 혈당을 제공하게 되어 비만 및 당뇨와 같은 질병의 발생율을 높일 수 있다(Maersk 등, 2012). 따라서 본 연구에서는 일반적인 쿠키 조성을 베이스로 하여 통밀이 첨가된 쿠키와 매생이 추출물이 첨가된 통밀쿠키를 제조한 뒤 정상 동물 모델에게 4주간 식이로 제공하였을 때, 통밀쿠키의 혈당 항상성 개선 효능 확인 및 통밀쿠키에 매생이 추출물이 첨가됨에 따라 향상되는 동반 상승 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

매생이 추출물(*Capsosiphon fulvescens* extract, CFE)의 제조

매생이는 전라남도 완도 소재의 누리원에서 냉동된 생물을 구입하였으며, 수돗물로 세척 후 이물질과 염분을 제거하고 동결 건조 하였다. 매생이로부터 혈당 강하 기능성 물질을 추출하기 위해 Han 등(2016)의 방법에 따라 70% 주정 에탄올을 용매로 사용하고 환류냉각식 추출장치를 이용하여 추출하였다. 매생이 동결 건조물의 양과 추출 용매의 양은 10배수로 하였으며, 용액이 끓는 온도에서 추출을 진행하였다. 원물과 용매를 분리하기 위해 여과지(Whatman No. 42, Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 이용하여 여과 후 추출 용액을 얻었다. 용매로 사용된 주정 에탄올을 제거하기 위해 rotary vacuum evaporator (UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 60°C, 감압 상태에서 농축을 진행하였다. 농축이 끝난 후 -70°C에서 냉각한 후 동결 건조 과정을 거쳐 최종적으로 제과에 사용되는 매생이 추출물(CFE)을 얻었으며 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

동물의 식이 제조

통밀 및 매생이 추출물의 첨가량을 표기한 쿠키의 배합조성은 Table 1에 나타내었으며, 동물 식이로 사용될 쿠키는 (주)주스앤그로서리로부터 다음과 같이 제조되어 제공받았다. 각 쿠키는 배합조성표에 맞게 재료들과 추출물 양을 계량하고 반죽 후 180°C로 예열된 오븐에 넣어 제조되었다. 쿠키 내에 첨가될 매생이 추출물 첨가량은 선행연구인 Nam 등(2014)의 결과에서 매생이 추출물 0.02 g/kg body weight (BW)에서 기능성이 확인되었고 Han 등(2016)의 결과에서 혈당 강하 효과를 보였던 통밀 매생이 식빵의 배합비를 참고하였으며, 전체 식빵 무게(10,104.1 g) 대비 CFE 첨가량(1.68 g)을 기반으로 총 쿠키 무게를 100%로 하였을 때 0.02%의 CFE를 첨가하는 것으로 결정하였고 마우스 한 마리 평균 무게 25 g, 평균 식이섭취량 3 g임을 고려하여 제공할 쿠키에 필요할 추출물의 양을 계산하여 Table 1와 같이 첨가하였다. 완성된 쿠키는 총 3개의 그룹으로 일반쿠키(normal cookie, NC), 통

Table 1. Ingredients and composition of cookies

Ingredients	NC ¹⁾	WC ²⁾	WCFE ³⁾
Soft flour	200	200	200
Whole wheat flour	0	30	30
Sugar	160	160	160
Whole egg liquid	50	50	50
Margarine	150	150	150
Baking soda	3	3	3
Baking powder	3	3	3
Salt	2	2	2
<i>Capsosiphon fulvescens</i> extract	0	0	0.12 (0.02%)
Total (g)	568.0	598.0	598.12

¹⁾NC; normal cookie

²⁾WC; whole wheat cookie

³⁾WCFE; WC blended with *Capsosiphon fulvescens* extract

밀쿠키(whole wheat cookie, WC) 및 통밀매생이 쿠키(WC blended with CFE, WCFE)로 명명하여 식이로 사용하였다. 식이의 보관은 수분의 출입이 없는 밀폐 용기에 넣어 실온 보관하였으며 매주 해당 케이지의 식이를 교체하였다.

실험 동물과 식이 제공 방법

NC와 WC, WCFE의 혈당 항상성 개선 효과와 관련 지표를 확인하기 위해 본 실험에 사용된 동물 모델은 일반적으로 독성 평가와 기능성 실험에 사용되는 C57BL/6N 마우스(수컷, 16-18 g, 6 주령)를 경기도 소재의 (주)오리엔트바이오에서 구입하여 사용하였다. 동물실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회에서 정해진 매뉴얼에 따라 동물실험을 진행하였다(승인번호 KUIACUC-2020-0096). 사육환경은 온도 20°C, 습도 50%, 명암주기 12시간 간격으로 유지하였고, 사육조건에 적응할 수 있도록 1주일 간의 순화 기간을 주었다. 식이는 순화 기간 이후 제공되었으며, 동물 그룹은 일반쿠키 식이를 제공한 NC 그룹, 통밀쿠키 식이를 제공한 WC 그룹, 통밀 매생이 쿠키 식이를 제공한 WCFE 그룹으로 총 3그룹으로 구성되었다. 각 그룹의 마우스의 수는 6마리로 하여 4주간 식이 제공 후 동물을 희생하였다.

체중, 식이량, 조직 무게 측정과 공복 혈당 측정

본 실험 기간 동안 각 그룹에 대해 체중과 식이량은 0주차부터 시작하여 4주차까지 매주 1회씩 측정하였다. 공복 혈당은 식이 0일차와 29일차에 15시간 절식 후 공복 상태의 마우스의 꼬리를 면도날을 이용하여 채혈하였고 간이 혈당 측정기(CareSens N, Seoul, Korea)로 측정하였다. 실험 동물의 간 및 신장 조직 무게는 희생 후 조직을 분리하여 칭량하였다.

경구당부하 검사(oral glucose tolerance test, OGTT) 측정

각 그룹의 OGTT는 4주간의 식이 제공이 종료된 29일차에 측정되었다. 경구당부하 검사 결과는 공복혈당과 마찬가지로 15시간 절식 후 포도당(2 g/kg body weight) 용액을 경구 투여한 후, 마우스의 꼬리에서 0, 30, 60, 90, 120분에 채혈하여 간이 혈당측정기를 이용해 혈당을 측정하였다(Winzell과 Ahren, 2004). 경구당부하 검사 결과의 곡선아랫면적(area under curve, AUC)은 Sigma Plot 12.5 program (Jandel Scientific, San Rafael, CA,

USA)을 사용하여 계산하였다.

혈청의 인슐린 농도 측정

혈청 내 인슐린 농도는 mouse insulin ELISA assay kit (Raybiotech, Norcross, Georgia, USA)를 이용하여 제시된 방법에 따라 마우스로부터 획득한 혈청을 처리하였으며, 450 nm 파장에 서 Hidex sense microplate reader (Hidex, Turku, Finland)로 흡광도를 측정하였다. 인슐린 저항성 평가를 위한 HOMA-IR (Homeostatic model assessment for insulin resistance) 방법은 공복 인슐린 농도($\mu\text{U/mL}$) \times 공복 혈당 농도(mg/dL) $\div 405$ 공식을 이용하여 산출하였다(Matthews 등, 1985).

포도당 수송체 관련 인자 mRNA 발현 측정

동물 희생 후 -70°C 로 보관된 간과 근육 조직을 이용하여 RNAiso PLUS (Takara, Seoul, Korea)을 800 μL 첨가한 뒤 chloroform (Burdick & Jackson, Muskegon, MI, USA)과 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 간과 근육 조직으로부터 mRNA를 얻었다. 분리된 mRNA는 nanodrop (ND-2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 RNA를 정량하고, CellScript™ cDNA Master Mix (CellSafe, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 cDNA를 얻었다. 다음의 primer는 Cosmo Gentech (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다; GLUT2 (forward, 5'-CTGCTCTTCTGTCCAGAAAGC-3'; reverse, 5'-TGGTGACATCCTCAGTTCCTC-3'), GLUT4 (forward, 5'-GTAACCTCATTGTCCGGCATGG-3'; reverse, 5'-AGCTGAGATC TGGTCAAACG-3'), Insulin receptor substrate (IRS)-1 (forward, 5'-TCCTATCCCGAAGAGGGTCT-3'; reverse, 5'-TGGGCATATAG CCATCATCA-3'), Phosphoinositide 3-kinases (PI3K) p85 α (forward, 5'-GCCAAGGAAACTGTCCGACACA-3'; reverse, 5'-GGGGCAGTGCTGGTGGATCCAT-3'). cDNA, 각 primer 및 SYBR Green Master mix (Elpis biotech, Daejeon, Korea)을 혼합 후 CFX connect Real-Time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 발현량을 측정하였으며, house-keeping gene 은 β -actin (forward, 5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'; reverse, 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3')을 사용하였다.

통계 분석

모든 실험결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의적 차이를 검증하기 위하여 $p < 0.05$ 수준에서 다중범위검정(Duncan's multiple range test)법과 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 Student t -test로 유의성을 검증하였다. 통계분석은 SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC)를 사용하여 진행하였다.

결과 및 고찰

NC, WC 및 WCFE의 섭취가 체중, 식이량 및 조직(간 및 신장) 무게에 미치는 영향

4주간의 식이 제공 종료 후 NC와 WC, WCFE를 제공한 그룹 간의 체중 및 식이량은 통계적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p < 0.05$, Fig. 1A 및 1B). 그러나 체중의 경우(Fig. 1A), 1주차 측정 결과에서 0주차 대비 체중 증감을 수치적으로 보았을 때 NC 그룹(2.56 ± 1.12 g 증가)에 비해서 WC 그룹(1.20 ± 1.16 g 증가)과 WCFE 그룹(1.87 ± 0.34 g 증가)이 낮은 체중 증가를 보였다. 이는 실험 동물의 쿠키 식이 제공 이후 첫 주이기에 단기 체중 증

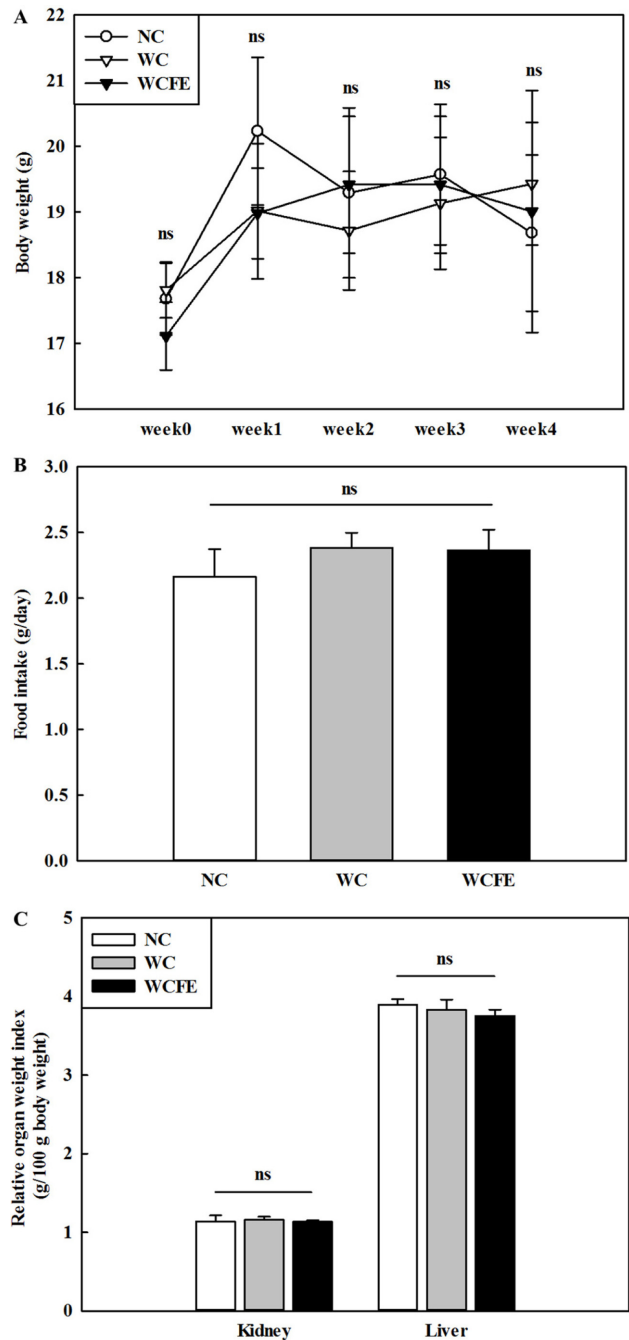


Fig. 1. Dietary effect of whole wheat cookie added with *Capsosiphon fulvescens* extract (WCFE) on body weight, relative organ weight and food intake in the mice fed for 4 weeks. (A) Changes of body weight and (B) Food intake during cookie diet. (C) Relative organ (liver and kidney) weight after sacrifice. NC, normal cookie; WC, whole wheat cookie; WCFE, WC blended with *Capsosiphon fulvescens* extract (CFE); six mice in each group. Data are represented as means \pm standard deviation (SD). ns is not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's method.

가는 NC 그룹과 비교했을 때 WC 그룹과 WCFE 그룹에서 낮아 졌음을 볼 수 있다. 쿠키의 경우 주식으로 섭취하기 보다는 단기간으로 섭취하는 기호식품이기에, 통밀 쿠키 또는 통밀매생이 쿠키를 단기간 섭취했을 때 일반 쿠키를 섭취했을 때보다 적은 체중 증가 효과를 기대할 수 있음으로 판단된다.

또한 간과 신장의 무게에서도 그룹 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p < 0.05$, Fig. 1C). 일반적으로 간과 신장에서 당뇨와 같은 외적인 스트레스를 받을 시에는 염증과 그에 관련된 단백질들이 발현되기 때문에 무게가 증가한다고 알려져 있다(Nannipieri 등, 2005; Steer 등, 1985). 그러나 Fig. 1C의 결과에서 간과 신장의 무게 측정값에 유의적인 변화가 없으므로 NC 그룹 대비 WC 그룹과 WCFE 그룹에서 통밀 및 매생이 추출물의 첨가가 간과 신장에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다.

NC, WC 및 WCFE의 섭취가 공복 혈당에 미치는 영향

통밀쿠키에 첨가된 매생이 추출물의 혈당 수치 감소 효과를 알아보기 위해 실험 동물 순화 후 0일차와 식이 종료 후인 29일차에 공복 혈당을 측정하였으며, 0주차의 공복 혈당 값의 편차에 의한 영향을 배제하기 위해 그룹 별로 0주차 대비 4주차 공복 혈당 값의 증감 비율로 나타내었다(Fig. 2A). 0주차의 공복 혈당 값과 비교했을 때 4주차에서 NC 그룹(0주차 대비 $98.71 \pm 8.27\%$)은 유의적인 차이가 관찰되지 않았는데, 이는 4주 간의 쿠키 섭취 기간이 만성적인 공복혈당의 증가를 불러올 만큼 충분한 기간이 아니었다고 판단된다. 반면, WC그룹(0주차 대비 $79.92 \pm 3.23\%$)과 WCFE그룹(0주차 대비 $80.83 \pm 5.17\%$)이 유의적인 차이를 보이며 공복 혈당이 감소되었음을 확인할 수 있었다($p < 0.001$). 본 실험의 결과는 일반 쿠키의 GI 지수(77)보다 낮은 GI지수를 갖는 통밀이 첨가된 쿠키 섭취로 인한 혈당 강하 효과라고 판단된다. 더불어 Shi 등(2016)의 연구 결과에 따르면 통곡물을 포함한 과일 및 채소를 다량 섭취하는 식이 패턴(vegetable rich pattern)이 당뇨 또는 당뇨의 전조증상인 공복혈당장애의 hazard ratio (HR)를 감소시켰고 이에 따라 본 연구결과에서 WC 그룹과 WCFE 그룹에서 공복혈당이 감소한 결과로 보았을 때 통밀쿠키 또는 통밀매생이쿠키가 당뇨 환자 또는 공복혈당장애를 가진 사람들이 섭취할 수 있는 대체 간식이 될 수 있을 것으로 판단된다.

NC, WC 및 WCFE의 섭취가 혈청 내 인슐린 농도 및 저항성(HOMA-IR)에 미치는 영향

인슐린은 혈액 속의 포도당을 근육, 간, 지방조직 등에서 효과적으로 이용하도록 하는데 중요한 역할을 하며, 인슐린의 합성과 분비가 잘 이루어지지 않거나 작용 기능이 떨어지면 인슐린 저항성이 발생하거나 당뇨가 유발된다(Remsberg 등, 2002; Sonksen과 Sonksen, 2000). 마우스로부터 분리한 혈청 내 인슐린 함량 측정 결과(Fig. 2B), NC 그룹($12.74 \pm 1.51 \mu\text{U/mL}$)과 WC 그룹($12.94 \pm 0.53 \mu\text{U/mL}$)에 비하여 WCFE 그룹($10.02 \pm 1.43 \mu\text{U/mL}$)에서 유의적인 차이를 보이며 감소하였다($p < 0.05$). 인슐린 농도와 공복 혈당 측정값을 통해 인슐린 저항성을 나타내는 지표인 HOMA-IR을 계산한 결과에서도 혈중 인슐린 농도와 같은 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 일본 당뇨병학회에서는 HOMA-IR 수치가 1.6 이하이면 정상이라고 하며, 2.5 이상이면 인슐린 저항성을 의심하도록 권고하고 있다(Choe 등, 2015). 또한 국내 연구에 따르면 HOMA-IR 수치가 2.3 이상이면 대사증후군이 동반될 확률이 높아지며 3.0 이상이면 인슐린 저항성이 있다고 보고 있다(Lee 등, 2006). Fig. 2C에서와 같이, 식이 4주차의 공복 인슐린 농도(Fig. 2B)와 공복 혈당 측정값(Fig. 2A)을 통해 HOMA-IR값을 산출했을 때, WCFE 그룹(1.41 ± 0.20)이 NC 그룹(1.73 ± 0.20)과 WC 그룹(1.72 ± 0.07)에 비하여 유의적인 차이를 보이며 감소하였다($p < 0.05$). 본 실험의 결과는 NC 그룹과 WC 그룹에서 인슐린 저항성이 증가하여 정상적인 인슐린 분비로 혈당이 정상화되지 않으면 이것을 극복하기 위해서 췌장의 β 세포에서 최대한 인슐린

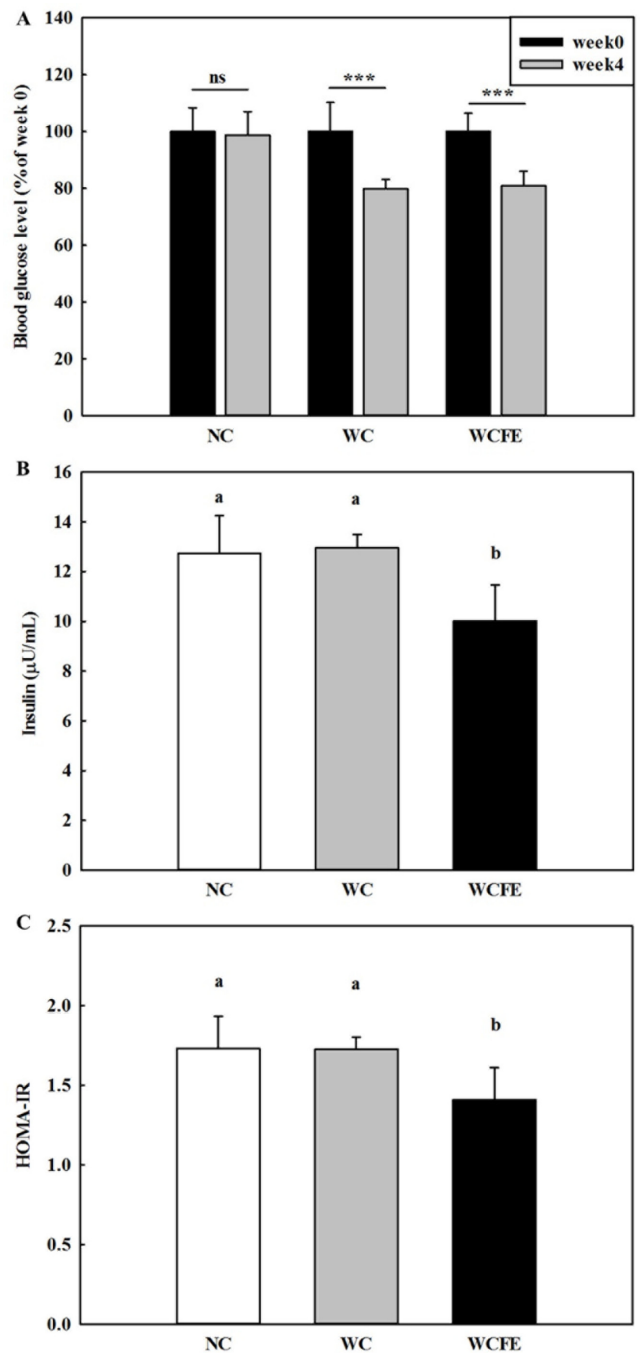


Fig. 2. Dietary effect of WCFE on fasting blood glucose, serum insulin level and homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR). (A) Comparison of fasting blood glucose level between week 0 and week 4. (B) Concentration of serum insulin level. (C) $\text{HOMA-IR} = (\text{fasting blood glucose} \times \text{fasting serum insulin}) / 405$. NC, normal cookie; WC, whole wheat cookie; WCFE, WC blended with *Capsosiphon fulvescens* extract (CFE); six mice in each group. Data are represented as means \pm SD. *** $p < 0.001$ versus week 0 according to Student's *t*-test. ns is not significant compared to week 0 at $p < 0.05$ according to Student's *t*-test. ^{a-b}Means in a row by different superscripts are significantly different at the $p < 0.05$ by Duncan's method.

의 분비를 증가시켜 혈당을 낮추려고 노력하므로 혈액내의 인슐린 농도가 정상의 경우보다 높아졌음을 나타낸다(DeFronzo 등, 1992). 일반쿠키와 통밀쿠키를 4주간 섭취했을 때 인슐린 저항성

에 미치는 영향을 매생이 추출물이 첨가됨으로써 감소시켰고 인슐린 저항성 개선 효과가 있을 것으로 판단된다.

NC, WC 및 WCFE의 섭취가 경구당부하검사(OGTT)에 미치는 영향

소화과정에서 섭취된 음식물은 이당 또는 다당류에서 단당인 포도당으로 분해되어 혈액을 통해 신체 전 기관으로 운반되며, 인슐린에 의해 간, 근육, 지방 등의 조직으로 이동되고 세포로 흡수되어 에너지로 사용되는데, 이러한 대사과정을 내당능(glucose tolerance)이라고 한다(Rao 등, 2004). 내당능은 보통 30-60분 사이에 혈당 수치가 최대치를 기록하고 90-120분 대에서 서서히 감소하여 공복 혈당 수준으로 돌아오게 된다(Sosenko 등, 2008). 하지만 인슐린 저항성으로 인한 당뇨와 같은 혈당 대사 이상이 있을 경우 혈당이 120분 이상까지 높게 유지된다고 보고된 바 있다(Sosenko 등, 2008). OGTT 측정 결과는 공복 혈당 수치의 영향을 배제하기 위하여 구간별 혈당 측정값에서 공복혈당 값을 빼서 표현하였다(Seki 등, 2020). OGTT 측정 결과(Fig. 3A), NC 그룹의 경우 30분대에서 혈당 값의 차이가 185.33±62.70 mg/dL로 최고치를 기록하였으며 120분대에서 11.83±8.37 mg/dL로 감소하는 것을 확인하였다. WC 그룹의 경우 30분대에서 혈당 값의 차이가 173.50±52.35 mg/dL로 최고치를 기록하였으며 120분대에서 27.00±8.39 mg/dL로 감소하는 것을 확인하였다. WCFE 그룹의 경우 30분대에서 혈당 값의 차이가 132.83±47.97 mg/dL로 최고치를 기록하였으며 120분대에서 -0.67±17.28 mg/dL로 감소하는 것을 확인하였다. Fig. 3A에서 각 그룹당 30분대의 최고 혈당 값의 차이를 비교해 보면, 표준 편차가 커서 p<0.05에서 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, 수치적으로 NC 그룹(185.33±62.70 mg/dL)과 WC 그룹(173.50±52.35 mg/dL)에서 높은 혈당 증가를 보인 반면, WCFE 그룹(132.83±47.97 mg/dL)에서는 NC 및 WC 그룹보다 각각 28.3% 및 23.4% 낮은 혈당 증가를 보였다.

또한, OGTT 결과를 한눈에 확인하기 위해 시간에 따른 혈당 변화 그래프의 면적을 수치화한 AUC의 면적 값이 의미하는 바는 수치가 낮을수록 빠른 시간 내에 혈당 수치가 기존 수준으로 되돌아오는 것을 의미한다(Jenkins 등, 1981). AUC 결과(Fig. 3B)에서 그룹 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 면적 값으로 비교해볼 때 WC 그룹(8752.5±1847.12)보다 WCFE 그룹(6962.5±1677.44)의 면적 값이 낮음으로 보아 통밀쿠키에 매생이 추출물이 첨가되었을 때 내당능에 도움을 줄 수 있는 것으로 기대된다.

사람에서 매생이 추출물이 첨가된 통밀 쿠키 섭취로 인한 혈당 개선 효과를 나타내기 위해 섭취해야 할 쿠키의 양은 human equivalent dose (HED)을 통해 구할 수 있다(Nair과 Jacob, 2016). $HED (mg/kg) = Animal\ dose (mg/kg) \times (Animal\ K_m / Human\ K_m)$ 이고 K_m 값의 경우 사람은 37, 마우스의 경우 3이기 때문에 동물의 섭취용량의 0.08을 곱하면 사람의 섭취 용량을 구할 수 있다. 매생이 추출물이 첨가된 통밀 쿠키를 섭취한 그룹(WCFE)의 평균 일간 섭취량은 2.36 g/day로 확인되었고 단위 체중(kg)당 섭취량은 121 g/kg BW이며 위 계산식에 대입하여 사람에게 적용되는 HED를 계산하면 9.68 g/kg BW/day로 산출되며 60kg의 성인이 매생이 추출물이 첨가된 통밀 쿠키 섭취로 인한 혈당 개선 효과를 나타내기 위하여 매일 580.8g의 쿠키(제조한 쿠키 10개 내외)를 섭취하는 다소 많은 정도의 양에 해당한다.

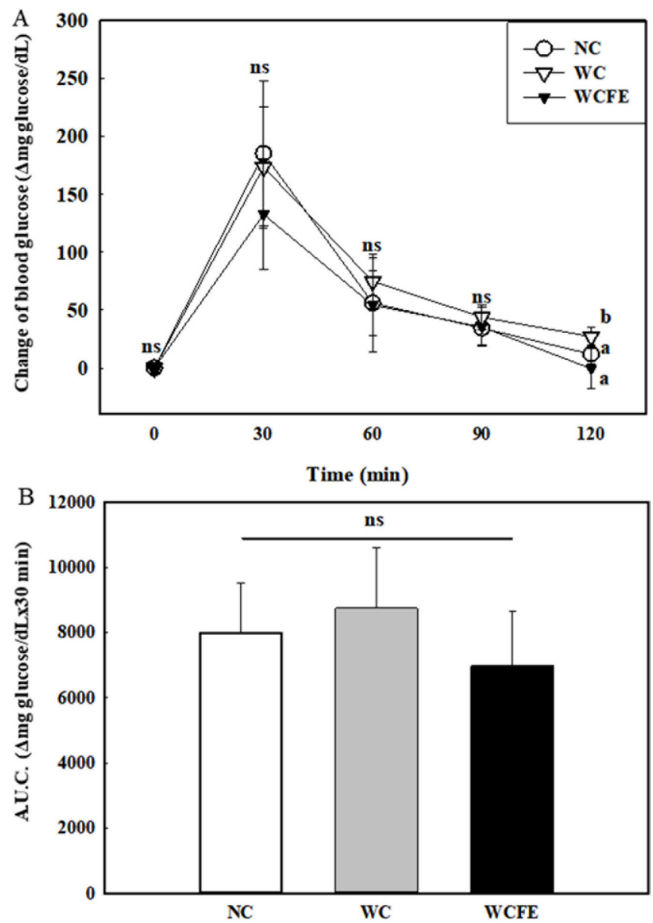


Fig. 3. Dietary effect of WCFE of oral glucose tolerance test (OGTT). (A) Changes of blood glucose levels while having the OGTT. (B) Area under the curve of blood glucose levels (AUC) after having the OGTT. NC, normal cookie; WC, whole wheat cookie; WCFE, WC blended with *Capsosiphon fulvescens* extract (CFE); six mice in each group. ^{a-b} Means in a row by different superscripts are significantly different at the p<0.05 by Duncan's method, ns is not significantly different at p<0.05 by Duncan's method.

NC, WC 및 WCFE의 섭취가 혈당 조절 및 인슐린 신호전달 경로에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향

GLUT는 세포막에 존재하는 막 단백질의 한 종류로서 포도당 대사에 밀접한 관련이 있다(Joost과 Thorens, 2001). GLUT2는 간, 췌장 β-세포, 소장 점막 그리고 신장에서 발현되는 주요한 혈당 수송체 단백질이며, 혈중 포도당 농도의 변화를 감지하는 필수적인 요인으로 중추신경계에서 포도당 항상성 및 음식 섭취를 조절하는 중추 포도당 감지 시스템에 관여한다(Jordan 등, 2010; Pénicaud 등, 2006). GLUT2는 혈중 인슐린 농도와 관계없이 혈당 수준에 따라 발현이 조절되며, 혈당 수준이 높아지면 GLUT2의 발현이 증가되어 혈중 포도당의 간 조직 내 세포로의 이동을 촉진함으로써 혈당 수준을 조절하는 것으로 알려져 있다(Im 등, 2006). GLUT4는 근육조직에서 발현되는 혈당 수송체 단백질로 혈중 인슐린에 의해 활성화되어 translocation에 의해 세포막에 위치하게 되고 혈중 포도당의 근육 조직으로의 수송을 촉진하여 혈

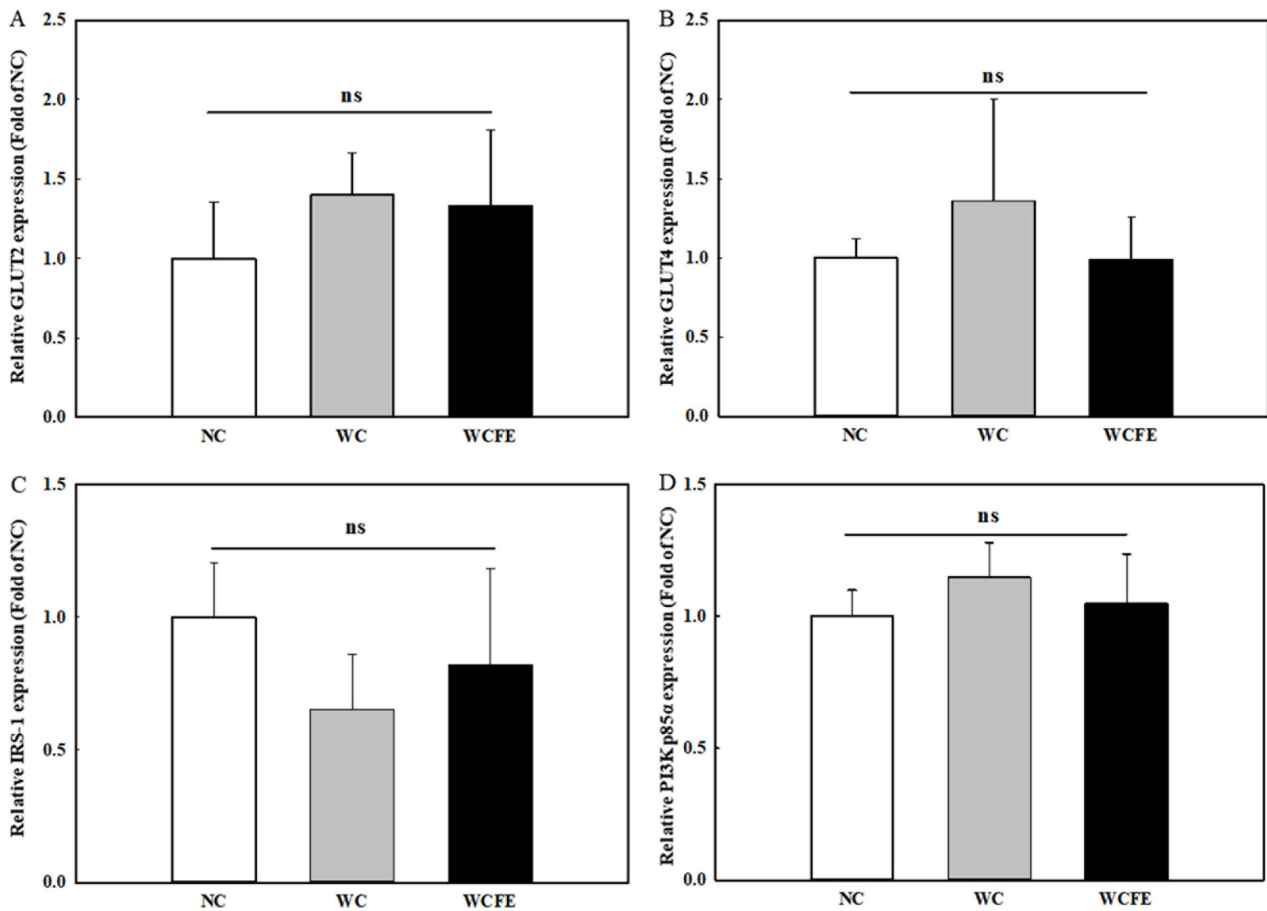


Fig. 4. Effect of WCFE on the expressions of (A) glucose transporter (GLUT) 2, (B) GLUT4, (C) insulin receptor substrate (IRS)-1 and (D) phosphoinositide 3-kinases (PI3K) p85 α genes in C57BL/6 mice. NC, normal cookie; WC, whole wheat cookie; WCFE, WC blended with *Capsosiphon fulvescens* extract (CFE); six mice in each group. Data are represented as means \pm SD. ns is not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's method.

당을 조절하는 것으로 알려져 있다(Huang 등, 2018). 본 실험의 GLUT2 (간)와 GLUT4 (근육)의 mRNA 발현 수준을 real-time PCR로 측정된 결과(Fig. 4A 및 4B), GLUT2와 GLUT4에서 모두 그룹간 유의적인 차이는 나타나지 않았으나($p < 0.05$), 수치적으로 보았을 때 GLUT2 결과(Fig. 4A)에서는 NC 그룹(1.00 \pm 0.11) 및 WCFE 그룹(0.98 \pm 0.26)과 비교하여 WC 그룹(1.36 \pm 0.63)에서 발현량이 제일 높은 것을 확인할 수 있었으며, GLUT4 결과(Fig. 4B)에서는 NC 그룹(1.00 \pm 0.35)에 비해 WC 그룹(1.40 \pm 0.26) 및 WCFE 그룹(1.33 \pm 0.47)에서 발현이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 통밀 쿠키를 섭취했을 때 간 조직과 근육 조직에서의 혈당 조절 인자인 GLUT2와 GLUT4의 발현을 증가시킴으로써 혈중 포도당을 세포 내로 흡수시켜 혈당을 조절하는 것으로 판단되며 매생이 추출물 첨가로 인한 효과는 없는 것으로 판단된다.

또한 인슐린에 의해 발현되는 GLUT4에 관여하는 신호전달 경로를 파악하기 위하여 근육 조직에서 IRS-1 및 PI3K p85 α mRNA 발현을 측정하였다. 그 결과 IRS-1의 경우 모든 그룹에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p < 0.05$), 수치적으로 보았을 때 NC 그룹(1.00 \pm 0.20)에 비해 WC 그룹(0.65 \pm 0.20)과 WCFE 그룹(0.82 \pm 0.36) 모두 발현이 감소되었고, WC 그룹에 비해 WCFE 그룹에서 발현이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 4C). PI3K p85 α 의 발현 또한 모든 그룹에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p < 0.05$), 수치적으로 보았을 때 NC 그룹(1.00 \pm 0.09)에 비해

WC 그룹(1.14 \pm 0.13)과 WCFE 그룹(1.04 \pm 0.18) 모두 발현이 증가하였고 WCFE 그룹이 WC 그룹보다 발현이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 4D). IRS-1은 인슐린, insulin-like growth factor 1, cytokine 등에 반응하여 tyrosine 잔기가 인산화되는 수용체 분자로 인슐린의 신호전달에 중요한 역할을 하며, 인슐린에 의해 IRS-1은 tyrosine이 인산화되면서 활성화되어 PI3K 등의 신호전달자를 구성한다(Gual 등, 2005). 인슐린에 의해 활성화된 인슐린 수용체는 PI3K 경로를 통해 GLUT4를 세포막으로 이동시켜 세포 내 포도당 흡수를 촉진하는데, 이 경로에서 PI3K에 의해 활성화되는 단백질인 atypical Protein kinase C (aPKC)는 GLUT4의 이동을 촉진하는 반면 IRS-1의 조절 부위인 serine 307 (Ser-307)을 인산화시켜 IRS-1과 인슐린 수용체의 상호작용을 방해함으로써 인슐린에 의한 PI3K 경로와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로가 활성화되는 것을 저해한다(Müssig 등, 2005). Ser-307의 인산화는 인슐린 수용체로부터 IRS-1을 분리하고, IRS-1의 tyrosine 잔기의 인산화를 감소시키며 IRS-1의 분해를 촉진한다(Gual 등, 2005). PI3K의 하류에 있는 aPKC가 PI3K의 상류에 있는 IRS-1의 활성화를 저해하는 음성 피드백 기작에 의해 인슐린의 작용이 신호에 특이적으로 조절될 수 있다(Huang 등, 2018; Lee 등, 2008). Choi 등(2020)의 연구에서 *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 빵잎 추출물을 수컷 Sprague-Dawley rat에 경구투여 했을 때 허벅지 근육조직에서 음성 피드백 기작에 의

해서 IRS-1의 발현이 저해되었다고 보고하였다(Choi 등, 2020). 본 연구 결과에서도 통밀에 의해 이러한 음성 피드백 작용이 발생하여 IRS-1의 발현이 저해되는 경향을 관찰할 수 있었지만 유의적인 차이는 없었으며($p < 0.05$), 매생이 추출물이 첨가되었을 때 통밀쿠키와 비교하여 PI3K p85 α 와 GLUT4의 발현수준이 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 혈당 관련 유전자의 발현에는 영향이 없는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 일반 쿠키(NC), 통밀 쿠키(WC) 그리고 매생이 추출물이 첨가된 통밀 쿠키(WCFE)를 제조하고 4주 동안 쿠키로만 이루어진 식이를 마우스에게 제공한 뒤 혈당과 관련된 지표들의 변화를 관찰하였다. 4주 섭취 이후 NC를 섭취한 그룹과 비교하여 WC와 WCFE를 섭취한 그룹에서 단기간의 체중 증가의 감소 효과를 보였으며, 매생이 추출물의 첨가는 간과 신장의 스트레스 증가에 영향이 없음을 확인할 수 있었다. 공복 혈당 수준은 WC 그룹과 WCFE 그룹에서 NC 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.001$). 혈청 인슐린 농도는 WCFE 그룹에서 유의적인 차이를 보이며 감소하였고($p < 0.05$), 이를 바탕으로 인슐린 저항성 관련 지표인 HOMA-IR를 산출 시 WCFE 그룹에서 유의적인 차이를 보이며 감소함으로써($p < 0.05$) 매생이 추출물이 첨가되었을 때 인슐린 저항성을 개선한 것으로 판단된다. 또한, OGTT의 30분대 혈당치에서 NC 그룹 및 WC 그룹과 비교하여 WCFE 그룹에서 혈당 증가 폭이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, WCFE 그룹에서 가장 낮은 AUC 면적 값을 나타냈다. OGTT 및 AUC 결과를 종합해볼 때 일반 쿠키와 통밀 쿠키에 비해 매생이 추출물의 첨가로 인해 내당능에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 혈당 관련 유전자인 GLUT2와 GLUT4의 경우, 통밀에 의해 발현이 증가하는 경향은 관찰되었으나 매생이 추출물 첨가에 의한 효과는 관찰되지 않았다. 또한 IRS-1의 경우 WC 그룹에 비해 WCFE 그룹의 발현이 증가하였고 PI3K p85 α 발현의 경우 WC 그룹에 비해 WCFE 그룹의 발현이 감소하는 경향을 보여, 매생이 추출물의 첨가가 혈당 관련 유전자의 발현에는 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다. 따라서, 이러한 결과를 종합했을 때 WCFE 섭취 시, 혈당 관련 유전자 발현에는 영향을 미치지 못하지만, 내당능 개선 효과를 가지며 인슐린 저항성 개선 효과의 가능성을 보여 혈당 항상성 개선에 기여할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 고려대학교 BK21 플러스 생명공학원 사업단의 지원 및 (주)주스앤그로서리(과제번호: Q2023071)의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

References

Adeva Andany MM, Pérez Felpete N, Fernández Fernández C, Donapetry García C, C PG. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci. Rep.* 36: 1-15 (2016)

Bae YJ. Relationship among practicing healthy diet and metabolic syndrome indicators in adults-from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2013~2014. *J. Nutr. Health.* 49: 459-470 (2016)

Cho EK, Yoo SK, Choi YJ. Inhibitory effects of maesaengi (*Capsosiphon fulvescens*) extracts on angiotensin converting enzyme and α -glucosidase. *J. Life Sci.* 21: 811-818 (2011)

Choe KJ, Kim WJ, Shin SY, Woo Y, Lee KH, Kim EJ, Shim MS, Kim JY. Association between change in body weight and insulin resistance in individuals at increased risk of diabetes. *Korean J. Med.* 89: 681-689 (2015)

Choi JS, Lee SH, Park YS. Anti-diabetic effect of mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52: 191-199 (2020)

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368 (1992)

Grover J, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* 81: 81-100 (2002)

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87: 99-109 (2005)

Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Médeau V, Kevorkian JP. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 34: S43-S48 (2008)

Han AR, Kim SW, Chun SH, Nam MH, Hong CO, Kim BH, Kim TC, Lee KW. Effect of diet containing whole wheat bread with *Capsosiphon fulvescens* and *Lindera obtusiloba* ethanol extracts on plasma glucose and lipid levels in rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 178-186 (2016)

Hong CO, Nam MH, Oh JS, Lee JW, Kim CT, Park KW, Lee DH, Lee KW. Pheophorbide a from *Capsosiphon fulvescens* inhibits advanced glycation end products mediated endothelial dysfunction. *Planta Med.* 82: 46-57 (2016)

Hu WS, Lee SJ, Pyo JH, Kim SH, Sung NJ. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Jerusalem artichoke Composites in Streptozotocin induced Diabetic Rats. *J Life Sci.* 28: 671-680 (2018)

Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* 14: 1483-1496 (2018)

Hwang EK, Amano H, Park CS. Assessment of the nutritional value of *Capsosiphon fulvescens* (Chlorophyta): developing a new species of marine macroalgae for cultivation in Korea. *J. Appl. Psychol.* 20: 147-151 (2008)

Im SS, Kim SY, Kim Hi, Ahn YH. Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic β cells and liver. *Curr. Diabetes. Rev.* 2: 11-18 (2006)

Jenkins D, Wolever T, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 362-366 (1981)

Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.* 18: 247-256 (2001)

Jordan SD, Könnner AC, Brüning JC. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 3255-3273 (2010)

Jung KJ, Jung CH, Pyeun JH, Choi YJ. Changes of food components in mesangi (*Capsosiphon fulvecense*), gashiparae (*Enteromorpha prolifera*), and cheonggak (*Codium fragile*) depending on harvest times. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 687-693 (2005)

Kim E, Vuksan V, Wong E. The relationship between viscosity of soluble dietary fiber and their hypoglycemic effects. *J. Nutr. Health* 29: 615-621 (1996)

Kim HY, Lee IS, Kang JY, Kim GY. Quality characteristics of cookies with various levels of functional rice flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 642-646 (2002)

Kim MS, Park JD, Lee HY, Kum JS. Effect of rice flour prepared with enzyme treatment on quality characteristics of rice cookies. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1439-1445 (2013)

Kim SW, Han AR, Chun SH, Nam MH, Hong CO, Kim BH, Kim TC, Lee KW. Levels of plasma glucose and lipid in rats fed bread supplemented with natural extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 77-85 (2016)

Kwon MJ, Nam TJ. Effects of Mesangi (*Capsosiphon fulvecens*) powder on lipid metabolism in high cholesterol fed rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 530-535 (2006)

Lee SH, Choi SH, Kim HJ, Chung YS, Lee KW, Lee HC, Huh KB, Kim DJ. Cutoff values of surrogate measures of insulin resistance

- for metabolic syndrome in Korean non-diabetic adults. *J. Korean Med. Sci.* 21: 695-700 (2006)
- Lee SH, Lynn EG, Kim Ja, Quon MJ. Protein kinase C- ζ phosphorylates insulin receptor substrate-1,-3, and-4 But Not-2: isoform specific determinants of specificity in insulin signaling. *Endocrinology* 149: 2451-2458 (2008)
- Maersk M, Belza A, Stødkilde-Jørgensen H, Ringgaard S, Chabanova E, Thomsen H, Pedersen SB, Astrup A, Richelsen B. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 95: 283-289 (2012)
- Matthews DR, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419 (1985)
- McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Wilson PW, Jacques PF. Whole-grain intake is favorably associated with metabolic risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 390-398 (2002)
- Müssig K, Staiger H, Fiedler H, Moeschel K, Beck A, Kellerer M, Häring HU. Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* 280: 32693-32699 (2005)
- Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 34: 121-138 (2013)
- Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 7: 27 (2016)
- Nam MH, Koo YC, Hong CO, Yang SY, Kim SW, Jung HL, Lee H, Kim JY, Han AR, Son WR, Pyo MC, Lee KW. In vivo study of the renal protective effects of *Capsosiphon fulvescens* against streptozotocin-induced oxidative stress. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 641-647 (2014)
- Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, Stern MP, Ferrannini E. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 28: 1757-1762 (2005)
- Park SY. Inhibitory Effect of Jeju Tea Extracts and Vanadate on Postprandial Hyperglycemia and Hypertension, and *In Vitro* Study. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* 52: 398-407 (2020)
- Pénicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9: 458-462 (2006)
- Rao SS, Disraeli P, McGregor T. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am. Fam. Physician* 69: 1961-1968 (2004)
- Remsberg KE, Talbott EO, Zborowski JV, Evans RW, McHugh-Pemu K. Evidence for competing effects of body mass, hyperinsulinemia, insulin resistance, and androgens on leptin levels among lean, overweight, and obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 78: 479-486 (2002)
- Rhee EJ. Prevalence and current management of cardiovascular risk factors in Korean adults based on fact sheets. *Endocrinol. Metab. (Seoul)* 35: 85-94 (2020)
- Seki E, Yamamoto A, Fujiwara Y, Yamane T, Satsu H, Ohkubo I. Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Katsuoibushi-Derived Peptides in Caco-2 Cell Assay and Oral Glucose Tolerance Test in ICR Mice. *J. Agric Food Chem.* 68: 6355-6367 (2020)
- Shi Z, Zhen S, Zimmet PZ, Zhou Y, Zhou Y, Magliano DJ, Taylor AW. Association of impaired fasting glucose, diabetes and dietary patterns with mortality: a 10-year follow-up cohort in Eastern China. *Acta Diabetol.* 53: 799-806 (2016)
- Sonksen P, Sonksen J. Insulin: understanding its action in health and disease. *Br. J. Anaesth.* 85: 69-79 (2000)
- Sosenko JM, Palmer JP, Rafkin-Mervis L, Krischer JP, Cuthbertson D, Matheson D, Skyler JS. Glucose and C-peptide changes in the perionset period of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care* 31: 2188-2192 (2008)
- Steer KA, Sochor M, McLean P. Renal hypertrophy in experimental diabetes: changes in pentose phosphate pathway activity. *Diabetes* 34: 485-490 (1985)
- Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53: S215-S219 (2004)
- Wu H, Flint AJ, Qi Q, Van Dam RM, Sampson LA, Rimm EB, Holmes MD, Willett WC, Hu FB, Sun Q. Association between dietary whole grain intake and risk of mortality: two large prospective studies in US men and women. *JAMA Intern. Med.* 175: 373-384 (2015)