

주요 Phytoestrogen들이 제2형 당뇨 마우스의 당질대사에 미치는 효과*

서보현 · 김광옥 · 이지혜 · 이혜성[§]

경북대학교 식품영양학과

Effects of Phytoestrogens on Glucose Metabolism in C57BL/KsOlaHsd-db/db Mice*

Seo, Bo-Hyeon · Kim, Kwang-Ok · Lee, Ji-Hye · Lee, Hye-Sung[§]

Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the antihyperglycemic effects of three phytoestrogens, genistein, coumestrol, and enterolactone, in type 2 diabetic animals. Forty male C57BL/KsOlaHsd-db/db mice were used as a diabetic animal model. The animals were divided into four groups and fed a phytoestrogen-free AIN-76 diet (control), or one of three phytoestrogen-supplemented (3.75 mg/100 g diet) AIN-76 diets for six weeks. During the experimental period, fasting blood glucose levels were measured on week 0, 2, 5, and 6 of the experiment, and oral glucose tolerance tests were performed on the 5th week. After the experimental period, blood concentrations of HbA1c, insulin, and glucagon were measured, and hepatic glycogen content and glucose regulating enzyme activities were analyzed. Fasting blood glucose, HbA1c level, and the area under the blood glucose curve in the oral glucose tolerance test were significantly lower in all of the phytoestrogen-supplemented groups compared to the control group. Plasma glucagon levels were also significantly lower in all of the phytoestrogen-supplemented groups compared to the control group. Hepatic glycogen level was significantly higher in the coumestrol-supplemented group compared to the other groups. However, there were no significant differences in the activities of glucokinase and glucose-6-phosphatase between the groups. These results suggest that all of the three major phytoestrogens tested in the present study were effective in lowering blood glucose levels in type 2 diabetic animals. However, further studies need to be conducted to elucidate the exact mechanism for the hypoglycemic effects of phytoestrogens. (Korean J Nutr 2011; 44(4): 275 ~ 283)

KEY WORDS: phytoestrogen, diabetes, hypoglycemic effect, db/db mice.

서 론

Phytoestrogen들은 estrogen 효과를 나타내는 비스테로이드계의 식물성분들로서 이들의 화학적구조는 estrogen의 활성형태인 estradiol과 유사하다. phytoestrogen에는 많은 종류들이 있으나 크게 isoflavones, lignans 그리고 coumestans의 세 부류로 나누어지며¹⁾ 두류, 종자류, 전곡류를 포함한 다양한 식물성 식품들에서 발견된다.²⁾ Isoflavone류는 다시 화학적 구조에 따라서 genistein, daidzein, glycitein의

세 종류가 있다.³⁾ Lignan류에는 식물성 lignan류로 secoisolariciresinol과 matairesinol이 대표적이며, 이들은 섭취 시 장내 미생물에 의해 동물성 리그난류인 enterodiol과 enterolactone으로 전환되고, 이들은 사람과 동물의 혈청, 소변, 담즙 그리고 정액 내에 존재하는 주요 lignan으로 알려져 있다.⁴⁾ Coumestan류에 속하는 주요 화합물로는 coumestrol과 4'-methoxycoumestrol이 있으며 이중 coumestrol은 자연 호르몬인 estrogen, estradiol과 구조가 유사하며 에스트로젠 수용체에 대한 결합 친화력이 genistein보다도 높은 것으로 알려져 있다.⁵⁾

Phytoestrogen들의 알려진 생리활성으로서는 지질대사와 심혈관계질환 개선,^{6,7)} 항산화활성,^{8,9)} 항암효과¹⁰⁻¹²⁾ 등이 보고되어 있다. 지금까지 phytoestrogen의 생리효과들은 주로 isoflavone류에 대해 가장 많이 이루어져 왔다.

최근 phytoestrogen들이 풍부한 식품의 섭취가 당뇨병의

접수일: 2011년 4월 8일 / 수정일: 2011년 5월 14일

채택일: 2011년 7월 27일

*This research was supported by the Kyungpook National University research fund in 2008.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hslee@knu.ac.kr

대사개선에도 유의할 수 있음을 보여주는 연구결과들이 속속 보고되고 있다. Ali 등¹³⁾은 유전적으로 비만과 당뇨를 가진 SHR/N-cp 쥐에서 콩 isoflavone의 투여 결과 혈당과 중성지방 농도가 감소되고, 혈장 insulin, leptin, glucagon 농도에 유의적인 개선효과가 있음을 보고하였다. 또한 genistein이 췌장 β 세포의 인슐린 분비를 촉진할 수 있다는 연구 보고도 있으며,¹⁴⁻¹⁶⁾ Lee¹⁷⁾와 Park 등¹⁸⁾은 각각 제1형과 제2형 당뇨 쥐에 genistein을 공급한 결과, 혈장 인슐린 농도와 해당과정 관련 효소 활성이 증가된 반면, 당신생 관련 효소 활성이 억제됨으로써 공복 혈당, 내당능, HbA1c 수준이 유의적으로 개선되었다고 보고하였다. Coumestan류 중에는 coumestrol에 대해 Beguin 등¹⁹⁾이 병아리에서 용량에 비례하여 혈장 콜레스테롤 농도를 감소시키는 효과를 보고하였다. 또한 Lignan류의 제1형 당뇨쥐에서의 공복 혈당 강하효과²⁰⁾와 아미씨의 제2형 당뇨쥐에서의 만성 신질환 합병증 예방효과가 보고되기도 하였다.²¹⁾ Prasad²²⁾는 식물성 리그난류인 secoisolaricresinol diglucoside가 제2형 당뇨병쥐의 산화적 스트레스 발생을 저해하고 혈청 총 콜레스테롤 및 당화해모글로빈 수준을 감소시킴으로써 제2형 당뇨병의 진행을 지연시킨다고 보고하였다.

이처럼 phytoestrogen들이 각종 만성 질환의 개선에 있어 효과적이라는 많은 연구보고들이 있어왔으나 기존에 행해진 연구들은 phytoestrogen의 복합체 또는 phytoestrogen이 많이 함유된 것으로 알려진 식품 자체를 시험재료로 사용하고 있어 그 속에 포함된 개별 phytoestrogen 물질들의 효능의 차이는 잘 알려져 있지 않다. 또한 phytoestrogen의 대표적인 세 부류인 isoflavone류, coumestan류, lignan류가 만성질환에 미치는 효능을 동일 실험에서 비교한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 현대인들에게 나타나는 가장 흔한 대사성 질환의 하나인 당뇨병에 대해 제2형 당뇨병 형질 전환 마우스를 실험동물로 하여 세 부류의 phytoestrogen이 당질 대사에 미치는 영향을 비교하고, 혈당 강하용 기능성 식품소재로서의 활용 가능성을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

실험동물은 (주)폴라스인터내셔널을 통해 미국 Harlan사의 5주령 웅성 C57BL/KsOlaHsd-db/db 마우스 40마리를 구입하여 환경이 조절된 사육실 (온도: $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도: $55 \pm 15\%$, 12 hr dark/light cycle)에서 고형사료와 물을 공급하면서 3주간 환경에 적응시켰다. 실험동물은 체중과 혈당농도를 바탕으로 각각 10마리씩 네 군으로 나눈 후, 1) AIN-76 기본 실험식이를 공급한 당뇨대조군 (Diabetic control; DC), 기본

식이에 3.75 mg/100 g diet 수준으로 2) Genistein (Fluka, 91955, China)을 보충한 GS군, 3) Coumestrol (Fluka, 27885, USA)을 보충한 CS군, 4) Enterolactone (Fluka, 45199, Switzerland)을 보충한 EL군으로 하여 6주간 실험식이를 제공하였다. AIN-76 식이를 기본으로 한 실험식이의 조성은 Table 1과 같다. 모든 실험식이는 열량영양소 비율을 동일하게 제조하였다. 식이 중 phytoestrogen의 투여 수준은 선행 연구²³⁾에서 isoflavone을 2.53 mg/100 g diet로 당뇨쥐에 투여하였을 경우, 간 독성 등의 유해작용 없이 체중감소를 억제하고, 당뇨쥐의 생존율을 증가시키며, 공복혈당 및 경구내당능 검사 시 혈당수준을 유의적으로 낮춤으로써 당뇨증상 개선 효과가 유의적이었음을 근거로 하여 이와 유사하되 농도 증가에 따른 부가적 효과를 관찰하기 위해 이 함량의 1.5배인 3.75 mg/100 g diet 수준으로 공급하였다.

식이와 수분 섭취량 및 체중의 측정

매일 일정한 시간에 식이와 수분을 공급하여 그 급여량과 잔여량의 차이로부터 1일 식이섭취량과 수분섭취량을 측정하였으며, 체중은 실험식이 공급 시작일을 0 day로 하여 희생전까지 매주 일정한 날에 변화를 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Experimental groups			
	DC	GS	CS	EL
g/100 g diet				
Corn starch	15.00	15.00	15.00	15.00
Sucrose	50.00	50.00	50.00	50.00
Casein	20.00	20.00	20.00	20.00
Corn oil	5.00	5.00	5.00	5.00
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00
AIN-76 Vitamin mix ¹⁾	1.00	1.00	1.00	1.00
AIN-76 Mineral mix ²⁾	3.50	3.50	3.50	3.50
Choline chloride	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
mg/100 g diet				
Genistein	-	3.75	-	-
Coumestrol	-	-	3.75	-
Enterolactone	-	-	-	3.75

1) AIN-76 vitamin mix (g/kg mix): thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, nicotinic acid 3, D-calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8 (500,000 IU/g), DL- α -tocopheryl acetate 20 (2,500 IU/g), cholecalciferol 0.0025, menaquinone 0.005, sucrose to make 1 kg
2) AIN-76 mineral mix (g/kg mix): calcium phosphate dibasic 500, sodium chloride 74, potassium citrate monohydrate 220, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganese carbonate 3.5, ferric citrate 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose to make 1 kg. DC: Diabetic control, GS: Genistein supplemented group, CS: Coumestrol supplemented group, EL: Enterolactone supplemented group

경구 내당능 검사 (Oral glucose tolerance test; OGTT)

실험식이 급여 5주 째 실험동물을 12시간 절식시켜 꼬리 정맥에서 채혈하여 공복 시 혈당을 측정한 후, 50% glucose 용액 (0.1 g glucose/100 g B.W)을 intubation tube를 사용하여 경구투여하고 30분, 60분, 120분 후 혈당을 측정하였다. 경구 내당능 검사결과 혈당곡선 아래 면적 (area under the curves; AUC)은 sigmaplot 8.0 program을 사용하여 계산하였다.

혈당 및 당화헤모글로빈 (HbA1c) 농도 측정

실험식이 급여 0, 2, 5, 6주째 실험동물을 12시간 절식시킨 후, 꼬리 정맥에서 채혈하여 Glucometer (Glucodr. supersensor, Allmedicus, Korea)를 사용하여 glucose-oxidation 방법²⁴⁾에 근거한 전기화학적 방법으로 공복 시 혈당을 측정하였다. 당화헤모글로빈 농도 (HbA1c)는 실험식이 급여 6주째 실험동물을 12시간 절식시킨 후, 꼬리 정맥에서 채혈하여 reflectometry를 이용한 Nycocard reader II (Axis-Shield Poc. AS, Norway)를 사용하여 측정하였다.

채혈 및 조직의 채취

희생 전, 실험동물을 12시간 절식시킨 후 혈액은 EDTA (10 mg/mL)가 처리된 주사기로 복부 하대정맥 (inferior vena cava)에서 채취하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 혈장을 분리하여 분석 시까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. 혈액 채취 후 즉시 간, 신장, 심장, 폐 조직을 적출하여 지방을 제거하고 냉장 생리 식염수로 3회 헹군 후 거즈로 수분을 제거하고 무게를 측정한 후 분석 시까지 -70℃에서 냉동 보관하였다.

간 조직 효소원의 조제

간 조직 1 g 당 5배의 0.25 M sucrose 용액을 가해 빙냉상태에서 homogenizer (IKA, T-10 basic, Germany)로 균질화한 후 600 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이를 다시 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고, 상층액은 105,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리 (Beckman, Optima TLX-120, USA)하여 cytosol 분획과 microsome 분획으로 분리하였다. Cytosol 분획은 glucokinase (GK)의 활성도 측정에 사용하였다. Microsome 분획은 0.25 M sucrose 용액에 현탁시켜 105,000 × g에서 1시간 동안 다시 초원심분리하여 얻은 침전물을 재현탁시킨 후 glucose-6-phosphatase (G6Pase) 활성도 측정에 사용하였다.

혈장 인슐린 및 글루카곤 농도 측정

혈장 인슐린 농도 (AKRIN-010T, Shibayagi Co. Ltd, Japan)와 글루카곤 농도 (PG090, Yanaihara institute Inc,

Japan)는 ELISA법을 이용한 키트를 사용하여 측정하였다.

간 조직 중 글리코겐 함량 측정

간 조직의 glycogen 함량은 Seifter 등의 방법²⁵⁾을 수정 보완하여 측정하였다. 간 조직 1 g 당 5배의 30% KOH 용액을 가하여 균질화시켜 100℃에서 20분간 가열한 후, 에탄올을 가하여 다시 100℃ 항온수조에서 5분간 가열하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 증류수에 녹여 글리코겐 함량 측정에 사용하였다. 글리코겐 함량은 Anthron 시약을 가한 후, 100℃에서 10분간 반응시켜 620 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다.

Glucokinase (GK) 활성도 측정

간 조직의 GK활성도 측정은 Davidson & Arion의 방법²⁶⁾에 따라 NAD⁺가 NADH로 환원되는 정도를 측정하였다. 즉, 83.33 mM hepes buffer (pH 7.4) 0.6 mL, 1 M KCl 0.1 mL, 25 mM dithioerythritol 0.1 mL, 75 mM MgCl₂ 0.1 mL, 10 mg/mL BSA 0.05 mL, 0.05 M NAD⁺ 0.01 mL, glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.01 mL, 1 M glucose 0.01 mL를 모두 섞은 혼합액에 효소원 0.01 mL를 넣고 37℃에서 10분간 방치한 후, 0.5 M ATP 0.01 mL를 넣어 340 nm에서 반응 개시 흡광도를 측정하고 37℃에서 10분간 배양시킨 후 동일 파장으로 반응종료 흡광도를 측정하여 흡광도 차이를 구하였다. GK 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg 당 1분간 생성된 NADH의 nmol로 나타내었다.

Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) 활성도 측정

G6Pase 활성도 측정은 Swanson 등의 방법²⁷⁾에 따라 일정량의 0.1 M Tris-maleate buffer (pH 6.5) 용액에 기질인 0.2 M glucose-6-phosphate 및 효소원을 첨가하여 30℃에서 20분간 반응시킨 후, 제단백하고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 acetate buffer (pH 4.0), ammonium molybdate 용액 및 환원시약을 넣어 발색시킨 다음 680 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 microsomal protein 1 mg이 1분당 생성시킨 phosphate의 양으로 나타내었다.

신장피질 중의 최종당화산물, N^ε-carboxymethyl lysine (CML)의 측정

신장피질은 잘게 절단하여 0.01 M PBS (pH 7.4)로 세 번 씻어낸 후 Folch 용액 (chloroform : methanol = 2 : 1)을 혼합하여 하룻밤 동안 가볍게 교반하여 지질 분획을 제거하였다. 고형분은 메탄올로 세 번, 증류수로 세 번 씻어 0.1 N NaOH를 넣고 균질화한 후 10,000 × g로 20분간 원심분리하여 상층액인 알칼리 용해 분획을 HCl을 사용하여 pH를 8로 맞추

후 최종분석에 이용하였다. 신장피질 중 CML의 측정은 Zarina 등의 방법²⁸⁾에 따라 monoclonal anti-CML-antibody를 이용하여 비경쟁 ELISA법으로 실시하였다.

단백질 정량

각 시료의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Bradford방법²⁹⁾에 의해 정량하였다.

자료의 통계처리

실험결과는 SPSS package program (version 14.0)을 이용하여 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 각 군의 평균치간의 차이에 대한 유의성은 one-way ANOVA (analysis of variance)와 Duncan's multiple comparison test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

체중변화, 식이 및 수분 섭취량

실험식이 공급 6주 동안 실험동물의 체중변화 및 평균 식이와 수분 섭취량은 Table 2와 같다. 실험기간동안 DC, GS, CS, EL의 모든 군에서 각각 5.34 ± 1.28 g, 4.22 ± 1.75 g, 5.39 ± 1.74 g, 6.01 ± 1.87 g의 체중감소를 보였으며, 각 군간 유의적인 차이는 없었다. 실험식이 공급 6주 동안 단위 체중 당 평균 식이 및 수분 섭취량은 모든 군에서 유의한 차이가 없었다.

내당능

실험식이 공급 1, 2, 5, 6주째의 공복혈당 수준은 Table 3과 같다. 1주, 2주째의 공복혈당은 모든 군에서 유의한 차이가 없었으며, 5주째에는 GS군 (436.63 ± 23.00 mg/dL)이 당노대조군 (493.75 ± 13.47 mg/dL)에 비해 유의하게 낮았고, 6주째에는 CS군 (521.88 ± 28.00 mg/dL)과 EL군 (514.00 ± 29.60 mg/dL)이 당노대조군 (631.25 ± 30.77 mg/dL)에 비해 유의하게 낮은 공복혈당 수준을 나타내었다.

실험식이 5주째 실시한 경우 내당능 검사 결과는 Table 4 및 Fig. 1과 같다. 포도당 투여 후 30분에 모든 군은 최대 혈당 수준을 보였고, 30분과 60분째의 혈당은 GS군 (534.50 ± 9.61 mg/dL, 491.63 ± 11.89 mg/dL), CS군 (549.63 ± 14.84 mg/dL, 499.75 ± 14.33 mg/dL), EL군 (540.71 ± 8.06 mg/dL, 465.43 ± 13.81 mg/dL)이 당노대조군 (602.75 ± 13.16 mg/dL, 550.13 ± 14.32 mg/dL)에 비해 유의하게 낮았고, 120분째의 혈당은 EL군 (435.86 ± 8.90 mg/dL)이 당노대조군 (506.63 ± 14.21 mg/dL)에 비해 유의하게 낮았다. 혈당반응곡선 아래의 면적 (area under the curves: AUC)은 GS군 ($58,572 \pm 1,032$), CS군 ($59,976 \pm 2,343$), EL군 ($57,193 \pm 620$) 모두 당노대조군 ($65,444 \pm 1,335$)에 비해 유의하게 낮은 수준을 나타냈다.

혈중 당화 헤모글로빈 농도 수준

혈중 당화 헤모글로빈 농도 수준은 Fig. 2와 같다. 실험식 공급 후, 6주째의 HbA1c를 측정한 결과, GS군 ($6.86 \pm 0.21\%$),

Table 2. The effect of phytoestrogen supplementation on body weight, feed and water intakes in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice during 6 weeks of experimental period

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight change (g)	Feed intake (g/g BW/day)	Water intake (mL/g BW/day)
DC	$34.22 \pm 0.42^{*ns}$	28.42 ± 0.80^{ns}	-5.34 ± 1.28^{ns}	0.13 ± 0.00^{ns}	0.98 ± 0.07^{ns}
GS	32.55 ± 0.52	28.27 ± 1.21	-4.22 ± 1.75	0.14 ± 0.01	1.03 ± 0.09
CS	33.75 ± 0.49	28.05 ± 1.72	-5.39 ± 1.74	0.14 ± 0.01	1.08 ± 0.11
EL	33.86 ± 0.79	27.11 ± 2.31	-6.01 ± 1.87	0.15 ± 0.01	1.17 ± 0.14

DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet)

'ns' indicates no significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test

*Mean \pm S.E.

Table 3. The effect of phytoestrogen supplementation on fasting blood glucose concentration in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice

Group	1st week	2nd week	5th week	6th week
(mg glucose/dL plasma)				
DC	$270.64 \pm 29.59^{*ns}$	497.00 ± 27.92^{ns}	493.75 ± 13.47^a	631.25 ± 30.77^a
GS	268.00 ± 27.23	549.75 ± 37.46	436.63 ± 23.00^b	565.63 ± 16.74^{ab}
CS	267.80 ± 28.86	530.63 ± 19.61	472.38 ± 20.48^{ab}	521.88 ± 28.00^b
EL	268.00 ± 30.07	542.29 ± 25.94	463.43 ± 10.46^{ab}	514.00 ± 29.60^b

DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet), ns: not significantly different among 4 groups ($p < 0.05$)

Different superscripts in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test

*Mean \pm S.E.

Table 4. The effect of phytoestrogen supplementation on glucose tolerance in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice

Group	Fasting	30 min	60 min	120 min	AUC
	(mg glucose/dL plasma)				
DC	493.75 ± 13.47 ^a	602.75 ± 13.16 ^a	550.13 ± 14.32 ^a	506.63 ± 14.21 ^a	65444 ± 1335 ^a
GS	436.63 ± 23.00 ^b	534.50 ± 9.61 ^b	491.63 ± 11.89 ^b	462.13 ± 14.21 ^{ab}	58572 ± 1032 ^b
CS	472.38 ± 20.48 ^{ab}	549.63 ± 14.84 ^b	499.75 ± 14.33 ^b	463.75 ± 24.88 ^{ab}	59976 ± 2343 ^b
EL	463.43 ± 10.46 ^{ab}	540.71 ± 8.06 ^b	465.43 ± 13.81 ^b	435.86 ± 8.90 ^b	57193 ± 620 ^b

DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet), AUC: Area under the curves in oral glucose tolerance test
Different superscripts in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test

*Mean ± S.E.

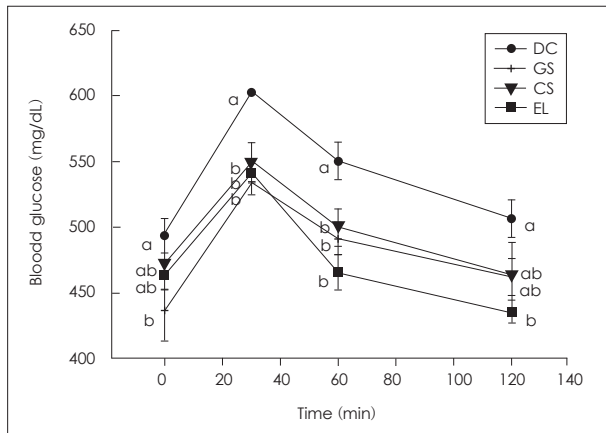


Fig. 1. Blood glucose curves in oral glucose tolerance test in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice. At the 5th week of the experimental period, the db/db mice were administered with glucose solution (0.1 g/100 g B.W) and the plasma glucose was determined at 0, 30, 60, 120 min after glucose load. DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet). Values are mean ± S.E. Different letters on the top of the vertical bars indicate significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test.

CS군 ($6.59 \pm 0.25\%$), EL군 ($6.89 \pm 0.13\%$)이 당뇨대조군 ($7.83 \pm 0.34\%$)에 비해 유의하게 낮았다.

혈장 인슐린 및 글루카곤 수준

혈장 인슐린 및 글루카곤 수준은 Table 5와 같다. 공복 시 혈장 인슐린 수준은 모든 군에서 유의한 차이가 없었으나, 글루카곤 수준은 GS군 (1.93 ± 0.006 ng/mL), CS군 (1.94 ± 0.008 ng/mL), EL군 (1.95 ± 0.007 ng/mL)이 당뇨대조군 (1.98 ± 0.008 ng/mL)에 비해 유의하게 낮았고, 글루카곤에 대한 인슐린 농도의 비는 모든 군 간에 유의한 차이가 없었다.

간 조직 중 글리코겐 함량과 당대사 관련 효소 활성화

공복 시 간 조직 중 글리코겐 수준은 Fig. 3과 같다. 글리코겐 수준은 CS군 (21.93 ± 4.07 mg/g tissue)만이 당뇨대조군 (6.48 ± 1.40 mg/g tissue)에 비해 유의하게 높았다. GK 활성화도와 G6Pase 활성화도는 Table 6과 같으며, 모든 군에서 유의

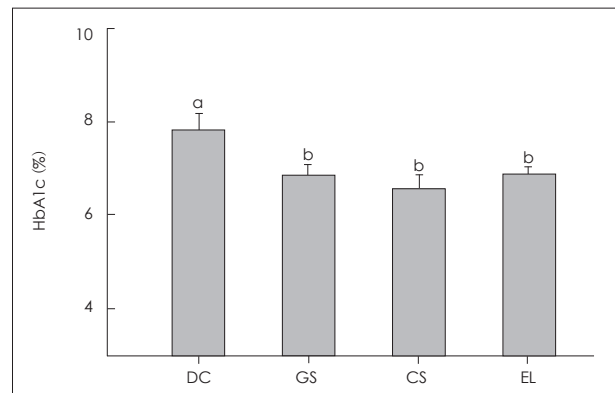


Fig. 2. The effect of phytoestrogen supplementation on HbA1c level in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice. The glycosylated hemoglobin values (HbA1c) are expressed as % of total hemoglobin. DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet). Values are means with their standard errors indicated by vertical bars. Different letters on the top of the bars indicate significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test.

한 차이가 없었다.

신장피질 중 최종당화산물 N^ε-(carboxymethyl)lysine 수준

신장피질 중 최종당화산물 CML수준은 Fig. 4와 같으며, 모든 군에서 유의한 차이가 나타나지 않았다.

고 찰

본 실험에 사용된 db/db 마우스는 leptin 수용체의 돌연변이로 인해 다식, 비만, 인슐린 저항성, 고혈당, 고인슐린혈증 등 제2형 당뇨병의 임상적 특징을 나타냄으로써 2형 당뇨병 및 인슐린 저항성에 대한 유전적 분석에 널리 이용되는 동물모델이다.³⁰⁾ db/db 마우스는 대개 12주령까지 고인슐린혈증과 체중증가를 보이다가 이후에는 혈당 인슐린 농도와 체중이 점차 감소하는 경향을 나타내는 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 본 실험에서 식이 공급 6주 동안 당뇨대조군과 모든 phytoestrogen

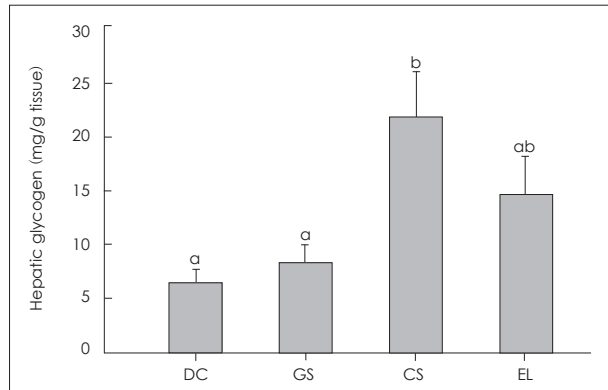
Table 5. The effect of phytoestrogen supplementation on plasma insulin and glucagon levels in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice

Group	Insulin	Glucagon	Insulin/Glucagon
	ng/mL		
DC	1.14 ± 0.22 ^{*ns}	1.98 ± 0.008 ^a	0.57 ± 0.11 ^{ns}
GS	0.96 ± 0.15	1.93 ± 0.006 ^b	0.49 ± 0.08
CS	1.28 ± 0.26	1.94 ± 0.008 ^b	0.65 ± 0.13
EL	1.17 ± 0.14	1.95 ± 0.007 ^b	0.66 ± 0.25

DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet), ns: not significantly different among 4 groups ($p < 0.05$)

Different superscripts in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test

*Mean ± S.E.

**Fig. 3.** The effect of phytoestrogen supplementation on hepatic glycogen level in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice. DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet). Values are means with their standard errors indicated by vertical bars. Different letters on the top of the bars indicate significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test.

보충군에서 체중감소가 일어났다 (Table 2). 본 실험에서 실험 식이의 공급은 실험동물이 8주령일 때 시작하였으며, 실험식이 공급 1주째까지는 체중이 증가하다가 2주째, 즉 9주령부터 체중이 감소하는 경향을 보여 체중감소가 예상보다 빠르게 시작되었다. 체중감소의 정도는 대조군과 phytoestrogen 보충군간의 유의적인 차이가 나타나지 않아 phytoestrogen의 보충이 제2형 당뇨병의 체중 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 또한 단위 체중 당 장기무게도 대조군과 phytoestrogen 보충군 간에 유의적인 차이가 없었다. 당뇨병 상태에서는 당이 세포내로 원활하게 유입되지 못하여 혈당이 증가되고, 그 결과 당이 소변으로 배설되게 되면서 다음 (polydipsia), 다뇨 (polyuria), 다식 (polyphasia)이라는 삼다증상 (3 polys)이 나타나게 된다. 본 실험에서는 phytoestrogen이 전형적인 당뇨병증세에 미치는 영향을 알아보기 위해 일일 식이

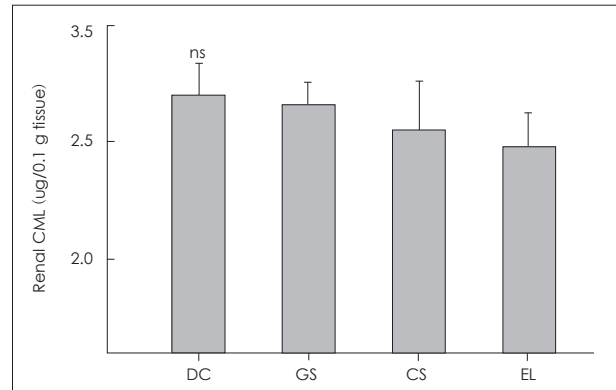
Table 6. The effect of phytoestrogen supplementation on hepatic glucose regulating enzyme activities in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice

Group	GK	G6Pase
	NADH nmol/min/mg protein	phosphate nmol/min/mg protein
DC	9.38 ± 1.44 ^{*ns}	50.72 ± 0.86 ^{ns}
GS	10.33 ± 2.00	51.47 ± 1.13
CS	7.36 ± 0.69	52.06 ± 1.10
EL	7.34 ± 0.71	50.89 ± 1.02

DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet), GK: Glucokinase, G6Pase: Glucose-6-phosphatase

'ns' indicates no significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test

*Mean ± S.E.

**Fig. 4.** The effect of phytoestrogen supplementation on renal N^ε-(carboxymethyl) lysine level in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice. DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet). CML: N^ε-(carboxymethyl) lysine. Values are means with their standard errors indicated by vertical bars. 'ns' on the top of the bars indicates no significant difference ($p < 0.05$) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test.

및 수분 섭취량을 측정한 결과, phytoestrogen 보충군과 당뇨병대조군 간 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이는 genistein과 daidzein 급여가 제2형 당뇨병동물에서 체중 변화와 장기무게 그리고 식이 섭취량에 영향을 미치지 않았다고 보고한 Park 등의 결과¹⁸⁾와 유사하였다.

공복혈당, 식후혈당, 당화헤모글로빈 (HbA1c)은 혈당조절의 정도를 반영하는 지표로 이용되고 있다. 제2형 당뇨병에서는 고혈당증은 대혈관 합병증의 위험과 깊이 연관되어 있으며,³²⁾ 특히 식후 고혈당증은 공복 시 고혈당증보다 대혈관 합병증의 위험에 대한 더 중요한 지표로 작용하고,³³⁾ 제2형 당뇨병환자에서 사망률을 증가시키는 원인으로 보고되어 있다.³⁴⁾ 한편, 혈중 당화헤모글로빈 수치는 적혈구의 평균 반감기인 7~8주 이전의 혈당치와 비례하므로 장기간 혈당 조절의 지표로서 이용된다. 당화헤모글로빈치는 정상인에서는 총 헤모글로빈

의 3~5% 정도로 존재하는 반면, 당뇨 환자의 경우에는 2~3 배 증가되므로 당뇨병과 내당능 장애 진단에 이용된다.³⁵⁾ 당화헤모글로빈의 농도는 혈중 포도당 농도보다 제2형 당뇨 환자의 망막병증 발병과 진행에 있어 더 의미있는 예측인자로 보고되어 있다.³⁶⁾ 본 실험에서 공복 혈당 수준은 실험식이 5주째에는 GS군이, 6주째에는 CS군과 EL군이 각각 당뇨대조군에 비해 유의하게 낮아졌다. 실험 5주째에 실시한 경구 내당능 검사에서는 내당능의 지표인 혈당반응곡선아래 면적이 모든 phytoestrogen 보충군들에서 당뇨대조군에 비해 유의하게 낮았고 (Table 4), HbA1c 수준도 모든 phytoestrogen 보충군들이 당뇨대조군에 비해 유의하게 낮았다 (Fig. 2). 이 같은 결과는 제1형과 제2형 당뇨쥐에 genistein을 투여한 선행 연구들^{15,18)}에서도 보고된 바 있다. 따라서 genistein과 함께 본 연구에서 사용된 coumestrol과 enterolactone과 같은 phytoestrogen들도 당뇨동물의 내당능을 개선시키는 효과를 가질 수 있는 가능성을 제시한다.

Phytoestrogen의 보충이 혈당 조절에 관여하는 주요 호르몬인 인슐린과 글루카곤의 분비에 미치는 영향을 본 결과, 혈중 인슐린 농도에는 유의적인 영향을 미치지 않았고, 글루카곤 농도는 모든 phytoestrogen 보충군들에서 대조군에 비해 그 정도가 미약하였으나 유의적으로 낮게 나타났으며, 글루카곤에 대한 인슐린의 비율에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 5). 이러한 결과는 genistein, coumestrol, enterolactone의 보충이 인슐린의 분비에 직접 영향을 미치지 보다는 글루카곤의 분비 감소에 영향을 미칠 수 있을 가능성을 제시한다. 앞서 phytoestrogen들의 투여군들이 유의적으로 낮은 공복혈당과 당화헤모글로빈 농도 및 내당능 개선을 나타낸 것은 인슐린의 분비 증가 보다는 글루카곤 분비의 저하에 의한 공복 시 포도당의 방출억제 또는 포도당의 신생합성의 억제에 의한 것일 가능성을 시사한다. 정상적인 상태에서 간 조직 중 글리코겐 대사는 인슐린과 글루카곤의 길항작용 뿐만 아니라, 여러 가지 호르몬들이 관련된 복잡한 기작을 통해 항상성을 유지한다. 그러나 제2형 당뇨병 상태에서는 일반적으로 간에서의 해당작용과 글리코겐 합성이 감소되고 당신생은 증가되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 공복 시 간 글리코겐의 함량은 모든 phytoestrogen 투여군들에서 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었고, 특히 coumestrol 보충군에서 유의적으로 높게 나타났다 (Fig. 3). 이와 같은 결과도 인슐린에 의한 포도당의 글리코겐 전환률의 증가보다는 글루카곤의 저하에 따른 글리코겐 분해의 억제에 의한 것일 가능성을 유추해볼 수 있다.

Glucokinase (GK)는 간 조직에서 일어나는 해당과정의 첫 단계에 작용하여 포도당 이용 속도를 결정하는 주된 효소

중 하나이며, G6Pase는 간 조직에서 당신생 과정과 글리코겐 분해과정의 마지막 단계에서 결정적 역할을 하는 효소로 GK와 G6Pase는 서로 상반된 역할을 통해 체내 포도당 이용의 균형을 유지한다. GK의 유전자 발현은 인슐린분비에 의해 촉진되고 글루카곤에 의해 저해되는³⁷⁾ 반면, G6Pase는 인슐린 분비에 의해 저해되고 glucocorticoid, cAMP 등에 의해 활성화되는데, 당뇨상태에서는 G6Pase/GK의 비가 증가되는 것으로 보고되고 있다.³⁸⁾ 본 실험에서 phytoestrogen의 보충은 종류에 관계없이 주요 당 대사 효소인 GK와 G6Pase 활성화에 대조군과 유의적인 차이를 나타내지는 않았다 (Table 6). 그러나 제1형 당뇨쥐와 제2형 당뇨쥐에 genistein을 각각 60 mg/100 g diet, 20 mg/100 g diet의 고복용량 수준으로 공급한 결과, GK와 G6Pase의 활성화에 유의적인 개선이 있었다는 보고들^{17,18)}도 있었는데, 이는 본 실험식이에 포함된 3.75 mg/100 g diet 수준의 phytoestrogen 농도와는 큰 차이가 있기 때문에 실험식이에 보충된 phytoestrogen 수준의 차이에 의한 것으로 유추해 볼 수 있다. 한편 신장 조직 중 최종당화산물로 알려진 CML의 농도 (Fig. 4)는 phytoestrogen 보충군들에서 낮은 경향을 보였으나 대조군과 유의적인 차이는 아니었다. 하지만 식이 보충량이 더 높거나 보충기간이 보다 장기적일 경우 유의적인 차이를 나타낼 가능성을 보여준다.

결론적으로 본 실험에서 phytoestrogen의 식이보충은 모든 phytoestrogen 투여군에서 공복 혈당과 혈당반응곡선아래면적 수준, 당화헤모글로빈 수준을 대조군에 비해 유의적으로 감소시킴으로써 내당능 개선효과의 가능성을 시사하였다. 또한 phytoestrogen 투여군들에서 혈장 글루카곤 수준의 감소가 있었으나 당대사 조절 효소인 GK와 G6Pase의 활성화에는 유의적인 차이가 없었으므로 본 연구에서 phytoestrogen의 혈당 저하작용의 기전으로서 글루카곤 분비의 감소가 글리코겐의 분해를 억제하여 혈중으로의 포도당 방출을 감소시킨 결과로 확인하기는 어렵다고 본다. 따라서 타 선행연구들^{17,18)}에서 고복용량의 genistein의 보충이 제2형 당뇨 동물에서 G6Pase와 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)의 활성을 저하시켰다는 결과로부터 phytoestrogen의 보충이 본 실험에서 측정된 G6Pase 이외의 당신생 과정의 주효소인 PEPCK의 활성을 저하시킴으로써 당신생 과정을 억제하였을 가능성도 유추해볼 수 있다. 또한 다른 선행 연구들^{20,39)}에서 보고된 phytoestrogen 그 자체의 소장에서의 포도당 흡수 저해효과에 의한 혈당 저하효과도 배제할 수 없다. 따라서 본 연구에서 사용한 phytoestrogen들의 혈당저하 효과의 기전을 밝히기 위해서는 향후 복용량-반응 연구와 보다 다양한 지표에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요하다고 본다.

요 약

본 실험은 주요 phytoestrogen에 속하는 genistein, coumestrol, enterolactone의 식이보충이 제2형 당뇨병동물모델에서 당질대사 개선에 미치는 효과를 알아보고자 C57BL/Ks-OlaHsd-db/db 마우스를 이용하여 내당능, 당화해모글로빈 농도, 당대사 관련 효소활성, 조직 중 글리코겐과 최종당화산물 수준 등을 측정하였다. 그 결과, phytoestrogen의 보충(3.75 mg/100 g diet)이 당뇨병동물의 체중변화, 식이 및 수분 섭취량 그리고 장기무게에는 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 모든 phytoestrogen의 보충은 당뇨병동물의 공복 혈당, 경구 내당능 검사 시 혈당반응곡선 아래면적 및 혈중 HbA1c 수준을 유의적으로 낮추었다. 또한 모든 phytoestrogen의 보충은 당뇨병동물의 혈장 글루카곤 수준을 유의적으로 낮추었으며, coumestrol과 enterolactone의 보충은 간 조직 중 글리코겐 수준을 유의적으로 증가시켰다. 이상의 결과들은 genistein, coumestrol, enterolactone의 3종 phytoestrogen의 식이보충이 제2형 당뇨병동물에서 내당능을 개선시킬 수 있음을 시사하였으나 그 기전에 대해서는 향후 추가 연구가 필요하다고 본다.

Literature cited

- 1) Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(2): 297-303
- 2) Lissin LW, Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6): 1403-1410
- 3) Ohta N, Kuwata G, Akahori H, Watanabe T. Isolation of a new isoflavone acetyl glucoside, 6'-O-acetyl genistin, from soybeans. *Agric Biol Chem* 1980; 44(2): 469-470
- 4) Setchell KD, Lawson AM, Conway E, Taylor NF, Kirk DN, Cooley G, Farrant RD, Wynn S, Axelson M. The definitive identification of the lignans trans-2,3-bis (3-hydroxybenzyl)-gamma-butyrolactone and 2,3-bis (3-hydroxybenzyl)butane-1,4-diol in human and animal urine. *Biochem J* 1981; 197(2): 447-458
- 5) Shemesh M, Lindner HR, Ayalon N. Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol. *J Reprod Fertil* 1972; 29(1): 1-9
- 6) Prasad K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis* 2005; 179(2): 269-275
- 7) de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, Grobbee DE, Jacques PF. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women: the Framingham study. *J Nutr* 2002; 132(2): 276-282
- 8) Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BM. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11): 2868-2874
- 9) Chen Y, Wei X, Xie H, Deng H. Antioxidant 2-phenylbenzofurans and a coumestan from *Lespedeza virgata*. *J Nat Prod* 2008; 71(6): 929-932
- 10) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993; 41(11): 1961-1967
- 11) Sarkar FH, Li Y. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 2003; 21(5): 744-757
- 12) Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzolillo PA, Zhang JX, Barnes S, Zhang X, Wei H, Brown NM. Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217(3): 358-364
- 13) Ali AA, Velasquez MT, Hansen CT, Mohamed AI, Bhatena SJ. Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. *J Nutr Biochem* 2005; 16(11): 693-699
- 14) Ohno T, Kato N, Ishii C, Shimizu M, Ito Y, Tomono S, Kawazu S. Genistein augments cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr Res* 1993; 19(4): 273-285
- 15) Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology* 1994; 134(4): 1975-1978
- 16) Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* 2006; 55(4): 1043-1050
- 17) Lee JS. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2006; 79(16): 1578-1584
- 18) Park SA, Kim MJ, Jang JY, Choi MS, Yeo J, Lee MK. Effect of genistein and daidzein on antioxidant defense system in C57-BL/KsJ-db/db mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35(9): 1159-1165
- 19) Béguin DP, Kincaid RL. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in chicks fed coumestrol, a phytoestrogen. *Poult Sci* 1984; 63(4): 686-690
- 20) Banskota AH, Nguyen NT, Tezuka Y, Nobukawa T, Kadota S. Hypoglycemic effects of the wood of *Taxus yunnanensis* on streptozotocin-induced diabetic rats and its active components. *Phytomedicine* 2006; 13(1-2): 109-114
- 21) Velasquez MT, Bhatena SJ, Ranich T, Schwartz AM, Kardon DE, Ali AA, Haudenschild CC, Hansen CT. Dietary flaxseed meal reduces proteinuria and ameliorates nephropathy in an animal model of type II diabetes mellitus. *Kidney Int* 2003; 64(6): 2100-2107
- 22) Prasad K. Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. *J Lab Clin Med* 2001; 138(1): 32-39
- 23) Shim JY, Kim KO, Seo BH, Lee HS. Soybean isoflavone extract improves glucose tolerance and raises the survival rate in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res Pract* 2007; 1(4): 266-272
- 24) Raba J, Mottola HA. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Crit Rev Anal Chem* 1995; 25(1): 1-42
- 25) Seifter S, Dayton S, Novic B, Muntwyler E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem* 1950; 25(1): 191-200
- 26) Davidson AL, Arion WJ. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts:

- physiological implications of higher cellular activity. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253(1): 156-167
- 27) Swanson MA. Phosphatases of liver. 1. Glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 1950; 184(2): 647-659
 - 28) Zarina S, Zhao HR, Abraham EC. Advanced glycation end products in human senile and diabetic cataractous lenses. *Mol Cell Biochem* 2000; 210(1-2): 29-34
 - 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* 1976; 72(1-2): 248-254
 - 30) Lee SM, Bustamante S, Flores C, Bezerra J, Goda T, Koldovský O. Chronic effects of an α -glucosidase inhibitor (Bay o 1248) on intestinal disaccharidase activity in normal and diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240(1): 132-137
 - 31) Orland MJ, Permutt MA. Quantitative analysis of pancreatic proinsulin mRNA in genetically diabetic (db/db) mice. *Diabetes* 1987; 36(3): 341-347
 - 32) Stancoven A, McGuire DK. Preventing macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: glucose control and beyond. *Am J Cardiol* 2007; 99(11A): 5H-11H
 - 33) Gerich JE. Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Arch Intern Med* 2003; 163(11): 1306-1316
 - 34) Hanefeld M, Temelkova-Kurktschiev T. Control of post-prandial hyperglycemia-an essential part of good diabetes treatment and prevention of cardiovascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002; 12(2): 98-107
 - 35) Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 1968; 22(2): 296-298
 - 36) Nathan DM, Singer DE, Godine JE, Harrington CH, Perlmuter LC. Retinopathy in older type II diabetics. Association with glucose control. *Diabetes* 1986; 35(7): 797-801
 - 37) Hers HG. Mechanisms of blood glucose homeostasis. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13(4): 395-410
 - 38) Barzilai N, Rossetti L. Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *J Biol Chem* 1993; 268(33): 25019-25025
 - 39) Vedavanam K, Sriyanta S, O'Reilly J, Raman A, Wiseman H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytother Res* 1999; 13(7): 601-608