

제2형 당뇨병 환자의 혈장 총항산화 방어체계의 지표로서 TRAPc(Total radical trapping antioxidant parameter, calculated)

아주대학교 의과대학 내분비대사내과학교실, 명지대학교 이과대학 식품영양학과¹

이관우 · 하애화¹ · 김현만

TRAPc as a Marker of Antioxidant System in Korean Type 2 Diabetic Patients

Kwan-Woo Lee, Aewha Ha¹ and Hyeon-Man Kim

*Department of Endocrinology and Metabolism, Ajou University School of Medicine
Department of Food and Nutrition, MyongJi University¹, Korea*

ABSTRACT

Background: It has been suggested that diabetic patients are under high oxidative stress and plasma MDA concentration is a reliable marker for oxidative stress. However, some studies showed that plasma MDA is not a good marker for oxidative stress. Recently, the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAPc) has been proposed as a marker for the overall antioxidant property of plasma samples. Therefore, in this study, we tried to evaluate whether MDA and TRAPc are reliable markers of the oxidative stress-antioxidant system or not.

Methods: The plasma samples from 67 type 2 diabetic patients and 31 normal subjects were collected. The plasma MDA, protein-bound SH groups, uric acid and vitamin C were determined by fluorophotometry or spectrophotometry. Plasma vitamin E concentration was analyzed by HPLC. Calculated TRAP (TRAPc) were determined by the proposed calculation methods.

Results: 1. Diabetic patients had significantly lower TRAPc, compared with normal subjects.
2. SH groups, uric acid, vitamin C and vitamin E were not different between the two groups.
3. MDA and MDA/TG were significantly higher in diabetic subjects.

Conclusion: From the results of this study, TRAPc seems to be a reliable parameter of overall plasma antioxidant system and the plasma MDA may be used as a marker of oxidative stress, but further long-term longitudinal studies are needed (J Kor Soc Endocrinol 14:134~141, 1999).

Key Words: Diabetes, Oxidative, Stress, Vitamins

접수일자: 1998년 12월 31일

통과일자: 1999년 2월 1일

책임저자: 이관우, 아주대학교병원 내분비대사 내과

서 론

당뇨병의 발병과 당뇨병성 만성합병증의 발생은 유전적, 대사적, 환경적 요인에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있으나, 최근 연구에 의하면 당뇨병의 발병과 그합병증의 병인론에 유리라디칼에 의한 여러 종류의 산화스트레스가 관여한다고 보고되고 있다[1~4].

유리라디칼은 단백질, 핵산, 생체막의 구조 및 기능에 영향을 미치며, 세포막에 존재하는 지질성분과 결합하여 과산화 지질을 형성하는 것으로 알려져 있다. 유리라디칼의 높은 반응성, 짧은 반감기, 그리고 매우 낮은 농도때문에, 산화스트레스를 생체내에서 직접 정량하기란 어려움이 있다. 그러므로 당화산물이나 지질 과산화물 등을 측정하여 산화적 손상의 정도를 간접적으로 측정하고 있다.

당뇨병 환자의 산화스트레스에 관한 연구에서는 혈청이나 적혈구의 과산화 지질의 정도 또는 항산화 효소의 활성도를 측정하는데, 여러 연구결과에서 고혈당으로 인해 지질산화도가 증가되었거나 또는 항산화 효소의 활성도가 저하되어 당뇨병군에서 높은 산화스트레스를 받고 있음이 제시되고 있다[5~7]. 즉, 당뇨병 환자에서는 산화스트레스가 증가하고 반면에 산화스트레스에 방어적인 역할을 하는 항산화제의 부족으로 인한 산화스트레스 항산화체계의 불균형이 당뇨병 발병과 합병증의 발생에 관여하는 것으로 추정되고 있다 [6,7]. 그러나 산화스트레스와 항산화방어기전에 관한 측정의 어려움으로 이에 대한 연구는 미비한 실정이다 [8,9].

산화스트레스의 지표는 지질과산화물인 혈장의 Malondialdehyde (MDA) 농도를 측정하여 평가할 수 있으며, 반면 산화스트레스에 방어적인 역할을 하는 항산화체계의 지표는 Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) 측정법이 있다. MDA 측정법[10~15]은 비교적 많이 사용되고 있으나, TRAP 측정법[16~21]은 그 타당성에 대해 최근 연구 논의되면서 부터 이에 대한 관심이 증대되고 있다.

MDA 농도를 측정하는 방법은 Thiobarbituric acid (TBA) assay에 의해 MDA 농도를 측정하는 것인데,

이것은 유리라디칼이 반감기가 짧고, 극히 불안정한 상태로 존재하여 유리라디칼에 의한 조직이나 세포의 산화적 손상을 직접 측정하기는 불가능하기 때문에, 간접적으로 유리라디칼이 세포막의 불포화지방산을 공격할 때 생기는 지방산의 연쇄산화반응중에 생성되는 지질과산화물인 MDA 농도를 측정하는 것이다 [10]. 그러나 MDA 농도측정은 몇 가지 문제점이 있다. 첫째 TBA 검사는 지질산화물 이외에도 일부의 단백질, 피리미딘, 헤모글로빈, 빌리루빈과 같은 물질들이 흡수되어 MDA 농도에 영향을 미치는 점[11~13], 둘째 MDA 농도 측정시 중성지방의 농도에 의해 영향을 받을 수 있어 중성지방으로 보정하면 당뇨병 환자와 정상인에서 차이가 없다는 점이다[16].

항산화방어기전에 대한 연구는 대부분 항산화 효소의 활성도와, 항산화비타민의 농도 측정으로 이루어져 왔으나[4~6,22], 최근에 산화적 손상과 항산화방어기전을 나타낼 수 있는 지표로서, TRAP 사용이 제안되어 쓰이고 있다[16,28,29]. TRAP는 혈장에 존재하는 항산화제들과 그 항산화제들과의 상호작용 등을 고려하여 혈장의 총항산화 방어능력에 대한 평가지표로서 사용된다. TRAP 측정법에는 직접적 측정법인 TRAPm (measurement)과 간접적 측정법인 TRAPc (calculation)가 있다. TRAPm은 형광물질을 이용하여 유리라디칼의 총소각능력을 실제로 측정한 것이며, 반면 TRAPc는 혈장의 4개 천연 항산화제인, SH groups, uric acid, vitamin C, vitamin E를 고려하여 수학적인 공식을 이용하여 계산한 것이다[16].

Ceriello A 등[16]의 연구에서는 직접 측정한 TRAPm 과 간접적으로 계산된 TRAPc 농도가 당뇨병 환자에서 정상인 보다 유의하게 낮았으며, 항산화체계를 나타내는 좋은 지표임을 보여 주었다. 그리고 직접 측정한 TRAPm과 간접적으로 계산된 TRAPc 사이에는 좋은 상관 관계가 있음을 보여 주었다[18].

이에 본 연구자들은 한국인 당뇨병 환자에서의 산화적 손상 지표로서 혈장의 MDA 농도 측정을 하고, 산화방어기전의 지표로서는 TRAPc 법을 채택하여 산화스트레스와 항산화체계를 비교 분석해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1996년 12월부터 1997년 8월까지 아주대 학교병원 내분비대사내과에 내원한 67명의 제2형 당뇨병 환자와 건강검진센터에 내원한 수진자 중 특별한 질병이 없는 31명의 정상 성인을 대상으로 하였다. 연구 대상자인 당뇨병 환자중 지질의 변화를 초래할 수 있는 급성질환이 있거나, 비타민제를 복용하는 경우, 흡연자, 인슐린 및 경구혈당강하제를 제외한 다른 약제를 사용하는 경우, 정상 성인에서는 비타민제를 복용하거나 흡연을 하는 경우를 대상에서 제외하였다.

2. 연구 방법

당뇨병성 만성합병증은 환자들의 임상 소견 및 이학적 소견, 신경학적 검사, 망막촬영, 흉부 X-선 검사, 심전도 검사 등을 통하여 미세혈관 합병증(신경증, 신증, 망막증)과 대혈관 합병증을 진단하였다. 연구 대상자들에서 신체계측검사, 일반생화학적검사, 지질검사(총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 콜레스테롤)를 시행하였고, 혈액을 공복시에 채취하여 -80℃에 냉동 보관하여 혈장 MDA 와 TRAPc를 측정하였다.

1) 혈장 MDA의 측정

혈장 MDA는 Yagi K 등의[10]의 방법에 따라 TBA 법으로 Spectrofluorometer를 이용하여 측정하였다. 200 μ L의 혈장에 1mL TBA 용액을 첨가하고, 100℃에서 45분 가열 후 냉각하였다. 그리고 5mL의 n-butanol/pyridine (15:1) 첨가 후 원심분리를 하고 그 상층액을 510 nm에서 spectrophotofluorometer(553nm for recording of emission value)로 측정한 후 MDA 농도를 1,1,3,3-tetramethoxypropane의 농도(0.156~2.5 μ mol/L)로 만든 표준곡선을 이용하여 계산하였다

2) TRAPc의 측정

TRAPc를 측정하기 위하여 vitamin E, vitamin C, protein bound SH (thiol) group, uric acid를 다음의 방법으로 측정하였다.

혈장 SH groups: 50 μ L의 혈장에 750 μ L의 0.1M

phosphate buffer (PH 7.4) 와 200 μ L DTNB(2 mM, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 혼합, 배양한 후 412 nm에서 spectrophotometer로 비색 정량하였다. 농도는 단백질 흡수계수를 이용하여 계산하였다[23].

혈장의 uric acid: Uric acid의 농도는 상업적으로 이용되고 있는 실험 kit를 사용하여 uricase와 peroxidase의 활성도를 조사하여 측정하였다.

Vitamin C: Vitamin C oxidase를 이용한 Tsan Z 등[24]이 제안한 방법으로 spectrophotometer로 측정하였다. 각각의 샘플마다 10 mL 튜브를 2개씩 준비하여 혈장, controls, vitamin C 0.2 mL를 첨가한 다음, 한 튜브에는 vitamin C oxidase를 0.1 mL 첨가하고 다른 튜브에는 효소를 첨가하지 않았다. 샘플을 잘 혼합한 후, 37℃의 물에서 15분간 배양하고 acetate buffer, TPTZ solution, FeCl₃ 6H₂O를 순서대로 혼합하였다. 상온에서 정확히 5분 보관 후 593 nm에서 비색 정량하였고 농도는 vitamin C의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

Vitamin E: HPLC (Hewlett Packard 1100)를 이용하여 Bieri G 등의 방법[25]에 따라 용매는 acetonitrile: methylene chloride: methanol (70:20:10)의 비율로 하고, 컬럼은 Beckman 5 μ m Ultrashpere C18를 사용하여 유속 1.4 mL/min로 측정하였다. 혈청 150 μ L에 internal standard 150 μ L를 첨가하고 30초 동안 혼합한 후 300 μ L의 hexane을 첨가하여 1,040g에서 5분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 증발시킨 뒤, 다시 100 μ L의 acetonitrile: methylene chloride: methanol (70:20:10)로 용해시킨 후 HPLC에 주입하였다.

Standard로는 α -tocopherol (Sigma Chemical Co), internal standard로는 tocopherol acetate를 사용하였다. 1mg의 α -tocopherol에 1mg tocopherol acetate를 넣고 50ml의 alcohol로 희석하였고 working solution은 stock solution의 농도가 0.4~1.0 μ g/mL되도록 ethanol로 희석하여 사용하였다.

TRAPc: Wayner DDM 등[17]과 Ghiselli A 등 [18]이 제안한 방법을 이용하여 계산하였다.

4종류의 천연 항산화제의 혈장 샘플에 대한 유리라디칼 총소각능력에 대한 상대적인 기여도를 고려하여

공식화된 계산법인 $2.0 (\text{vitamin E}) + 0.66(\text{SH}) + 1.7 (\text{uric acid}) + 1.3 (\text{vitamin C})$ 를 사용하였다.

3. 통계

모든 측정 결과는 평균±표준오차로 표시하였고 SPSS package program을 이용하여 student t-test 및 ANOVA로써 비교 분석하였다. 또한 regression검증을 통하여 각 변수들간의 상관관계를 조사하였다. 유의수준은 0.05 미만으로 정하였다.

결 과

1. 연구대상자의 임상적 특성

당뇨병군이 정상군에 비하여 평균 연령이 높았고, 체질량지수는 양군간에 차이가 없었다. 총콜레스테롤과

중성지방은 양군간에 차이가 없었으나, 고밀도 콜레스테롤은 당뇨병군이 정상군에 비하여 낮았다 ($p<0.05$) (Table 1). 당뇨병 환자 67명 중 한 가지의 합병증이라도 있던 환자는 20명이었으며, 그 합병증은 망막증, 신증, 신경병증의 순이었다. 당뇨병성 합병증이 있던 군과 합병증이 없던 군 사이에는 나이, 체질량지수, 당화혈색소 및 고밀도 콜레스테롤 농도에는 유의적 차이가 없었다.

2. 산화스트레스와 항산화체계에 대한 측정

산화스트레스의 지표인 혈장 MDA는 당뇨병군이 정상군에 비하여 유의하게 높았으며 (1.02 ± 0.08 vs $0.54 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$, $p<0.05$), MDA를 혈장 중성지방 농도로 보정한 후에도 당뇨병군이 높은 결과를 나타내었다 (Table 2). 혈장 vitamin C, vitamin E 및 총콜레

Table 1. The Clinical Characteristics and Biochemical Data in Diabetics and Control Subjects

	Diabetic patients (n=67)	Control subjects (n=31)
Age (yr)	52.3 ± 10.1*	45.7 ± 7.2
BMI (kg/m ²)	24.3 ± 3.2	23.7 ± 3.0
Total cholesterol (mmol/L)	5.2 ± 1.2	5.1 ± 0.7
LDL cholesterol (mmol/L)	3.3 ± 1.1	3.0 ± 0.6
HDL cholesterol (mmol/L)	1.1 ± 0.3*	1.3 ± 0.4
Triglycerides (mmol/L)	1.9 ± 1.0	1.6 ± 0.7

Data are means ± SE. *: $p<0.05$ compared with control subjects

Table 2. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters in Diabetic and Control Subjects

	Diabetic patients (n=67)	Control subjects (n=31)
TRAPc ($\mu\text{mol/L}$)	850.4 ± 22.3*	949.5 ± 38.8
SH group ($\mu\text{mol/L}$)	452.7 ± 24.4	484.7 ± 19.7
Uric acid ($\mu\text{mol/L}$)	273.7 ± 9.2*	320.4 ± 16.4
Vitamin C ($\mu\text{mol/L}$)	43.4 ± 4.5	41.3 ± 5.8
Vitamin E ($\mu\text{mol/L}$)	15.0 ± 0.6	15.6 ± 0.9
Vitamin E ($\mu\text{mol/L}$)/cholesterol (mmol/L)	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.2
Plasma MDA ($\mu\text{mol/L}$)	1.02 ± 0.08*	0.54 ± 0.07
Plasma MDA ($\mu\text{mol/L}$)/TG (mmol/L)	0.72 ± 0.09*	0.44 ± 0.07

Data are means ± SE. *: $p<0.05$ compared with control subjects.

Fig. 1. The plasma MDA among groups.

DM with Cx: diabetes with complications
DM without Cx: diabetes without complications

Fig. 2. The plasma MDA/TG among groups

DM with Cx: diabetes with complications
DM without Cx: diabetes without complications

스테롤로 보정한 vitamin E는 양군간에 유의적인 차이가 없었다. 하지만 혈장의 뇨산치는 당뇨병군이 정상군에 비하여 유의하게 낮았으며 (273.7 ± 9.2 vs $320.4 \pm 16.4 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$), SH group 측정치는 당뇨병군에서 정상군에 비하여 낮았으나, 통계적인 유의성은 없었다 (Table 2). 항산화체계의 지표인 TRAPc는 당뇨병군에서 정상군에 비하여 유의하게 낮았다 (850.4 ± 22.3 vs $949.5 \pm 38.8 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$) (Table 2).

혈장 MDA와 TRAPc 측정치에 대하여 당뇨병군을 당뇨병성 합병증이 있는 군과 당뇨병성 합병증이 없는

Fig. 3. TRAPc among groups

DM with Cx: diabetes with complications
DM without Cx: Diabetes without Complications

군으로 나누어 비교하였을때, 혈장 MDA는 당뇨병성 합병증이 있는 군과 없는 군 모두 정상군 ($0.54 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$)에 비하여 유의적으로 높았고 ($p < 0.05$), 당뇨병성 합병증이 있는 군과 당뇨병성 합병증이 없는 군 사이에 통계적인 유의성은 없었다 (0.92 ± 0.6 vs $1.08 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$) (Fig 1). 중성지방으로 혈장 MDA를 보정한 결과도 정상군보다 합병증이 없는 군이 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보인 반면 (0.44 ± 0.07 vs $0.80 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$), 당뇨병성 합병증이 있는 군과 없는 군간의 통계적 차이는 나타나지 않았다 (0.58 ± 0.4 vs 0.80 ± 0.7) (Fig 2). TRAPc는 정상군보다 당뇨병성 합병증군이 유의적으로 낮은 값을 나타냈지만 (949.5 ± 38.8 vs $814.3 \pm 140.2 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$) 당뇨병성 합병증의 유무에 따른 비교에서는 차이를 나타내지 않았다 (814.3 ± 140.2 vs $873.4 \pm 203.5 \mu\text{mol/L}$) (Fig 3).

고 찰

당뇨병 및 당뇨병성 합병증에서 산화스트레스 항산화체계가 중요한 역할을 한다는 것이 제안되고 있는데, 그 측정 방법에 대해서는 아직도 상반된 이론들이 존재하고 있다. 본 연구는 한국인 당뇨병 환자를 대상으로 MDA 측정으로 산화스트레스를 측정하고

TRAPc 측정으로 항산화체계를 측정한 결과, 당뇨병 환자에서 정상인에 비하여 산화스트레스가 높고 반면에 항산화체계는 낮은 것을 보여 주어, 당뇨병 환자가 산화스트레스-항산화체계의 불균형 상태에 있음을 나타내 주었다. 이는 Jain SK 등[2]과 유헌준 등[3]의 다른 연구자들의 결과와 일치한다.

혈장 MDA는 당뇨병 환자에서 증가되어 있었으며, 혈장 MDA를 증성지방으로 보정한 MDA/TG 치도 역시 당뇨병 환자에서 의미있게 증가되어 있었다. 이와 같은 결과로서 당뇨병 환자에서 산화적 스트레스를 나타내는 지표로서 혈장 MDA, 혈장 MDA/TG 치가 유용할 것으로 생각되나, 이는 Ceriello A 등[16]과 Nacitarhan S 등[26]의 연구 결과와는 상반되는 결과이다.

그러나 당뇨병성 합병증에서 지질과산화가 증가한다는 다른 결과들[27~30]과는 달리, 본 연구 결과는 당뇨병성 합병증이 있는 환자군에서 혈장 MDA가 가장 높기는 하였지만 유의적 차이는 없었다.

혈장에 존재하는 항산화제와 그들의 상호작용 등을 고려하여 제안된 혈장의 총항산화 방어능력에 대한 지표인 TRAPm은 형광물질을 이용하여 유리라디칼의 총소각능력을 실제로 측정하는 것인데, 본 연구에서는 실험여건의 관계로 인해 측정하지 못하였다. 그러나 이미 다른 연구[13,14]에서 TRAPm과 TRAPc의 좋은 상관 관계를 보여 주었기 때문에, 본 연구에서는 TRAPc만을 측정하였다. TRAPc는 혈장의 4개 천연 항산화제인, thiol groups, uric acid, vitamin C, vitamin E를 고려하여 수학적 공식을 이용하여 계산한 것이다[16]. 본 연구결과는 조사된 4개 항산화제중 vitamin E와 vitamin C의 경우, 두 당뇨병군과 정상군 간에 유의적인 차이가 없었다. 당뇨병 환자에 있어 혈장 vitamin E와 vitamin C에 관한 연구들은 상반된 결과들을 보여 왔다[31~34]. 혈장의 vitamin E의 농도는 혈장의 지단백질인 증성지방과 저밀도 콜레스테롤의 농도와 관련이 있다. 그러므로 이러한 인자가 실험 결과에 반영되었는지의 여부가 아마도 이러한 상반된 결과를 가져왔을 가능성이 있다. 본 연구는 vitamin E를 증성지방으로 보정한 결과를 제시하여 이러한 인자의 영향에 대한 실험적 오차를 최소화 하였다.

본 연구에서 vitamin C와 vitamin E를 포함한 혈장의 총항산화 방어기전 TARPC는 당뇨병군이 정상군에 비해 유의적으로 낮았으며, 이는 당뇨병 환자가 항산화 방어기전의 약화로 인한 심각한 산화적 손상에 있음을 의미한다. Vitamin C와 vitamin E는 항산화제로써 상호보완적인 기능을 가진다. vitamin E는 연쇄 반응에서 생성된 불안정한 과산화 화합물에 수소원자를 제공하므로써 활성을 잃은 안정된 화합물로 전환시키고 자신은 짝을 잃은 라디칼의 상태로 존재한다. 이러한 vitamin E 라디칼에 vitamin C가 다시 수소를 제공함으로써 vitamin E가 계속적으로 항산화 기능을 할 수 있게 하여 준다. 따라서 vitamin C나 vitamin E를 항산화제로써 개별적으로 연구하는 것보다 총항산화 방어체계에 대한 상대적인 공헌도를 고려하여 연구하는 것이 항산화 방어체계에 대한 더 좋은 지표가 될 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구 결과를 통해 당뇨병 환자는 정상인에 비해 유의적으로 높은 산화스트레스를 받고 있으며 체내 총항산화 방어체계 또한 정상인보다 현저하게 약화되어 있음을 알 수 있었다.

요 약

연구배경: 당뇨병 환자는 높은 산화스트레스를 받고 있고, 혈장 MDA 농도가 이러한 산화스트레스에 대한 신뢰성 있는 지표로 제시되어지고 있다. 그러나 몇몇 연구들에서는 혈장 MDA 농도가 산화스트레스에 대한 지표로서 부적절하다고 보고하고 있다. 최근에는 total radical-trapping antioxidant parameter (TRAPc)가 혈장에서의 전반적인 항산화방어체계에 대한 지표로 제시되어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 제2형 당뇨병 환자에서 산화스트레스와 항산화방어체계에 대한 지표로서 MDA와 TRAPc의 유용성을 알아 보고자 하였다.

방법: 제2형 당뇨병 환자 67명과 정상인 31명을 대상으로 산화스트레스와 항산화방어체계의 정도를 측정하였다. 혈장 MDA와 SH group, 요산, vitamin C는 fluorphotometer 또는 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 혈장 vitamin E 농도는 HPLC에 의하여

분석하였다. 또한 제시되어진 계산법을 이용하여 TRAPc를 산출하였다.

결과: 당뇨병군에서 TRAPc가 정상군보다 유의적으로 낮게 나타났으나 각각의 SH group, 요산, vitamin C, citamin E의 농도는 두 군간에 차이를 보이지 않았다. MDA와 MDA/TG의 값은 당뇨병군에서 높게 나타났다($p<0.05$).

결론: 본 연구의 결과로부터, TRAPc는 혈장의 전반적인 항산화체계의 신뢰성 있는 지표가 될 수 있으며, 혈장 MDA 또한 산화스트레스의 지표로써 사용되어질 수 있을 것이다. 그러나 좀더 장기간의 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. 하애화, 노혜립, 조정순, 정윤석, 이관우, 김현만: 만성합병증을 동반한 제2형 당뇨병 환자에서 산화스트레스와 항산화 방어체계. *당뇨병* 22:253-261, 1998
2. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B: *Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. Metabolism* 39:971-975, 1990
3. 유형준, 임성희, 김병태, 장연복, 최문기, 박성우: 당뇨병 환자의 적혈구막 지질과산화에 미치는 가령의 영향. *대한내분비학회지* 8:281-286, 1993
4. Macrury SM, Gordon D, wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, Rumley AG, Maccuish AC: *A comparison of different methods of assessing free radical activity in type II diabetes and peripheral vascular disease. Diabet Med* 10:331-335, 1993.
5. Ceriello A, Russo P D, Amstad P, Cerutti P: *High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Diabetes* 45:471-477, 1996
6. 조희충, 김미자, 서정철, 조영호, 안기완, 정종훈, 박찬국, 이승일, 배학연, 이병래: 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 적혈구에서 당농도에 따른 항산화 효소 활성도의 변화. *당뇨병* 18:337-343, 1994
7. Higuichi Y: *Lipid peroxides and a-tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. Acta Ned Okayama* 36:165-175, 1982
8. 장학철, 민헌기, 한인권: 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 적혈구막 지질 과산화 현상. *당뇨병* 16:309-316, 1992
9. Stringer MD, Gorog PG, Freedmen A, Kakkar W: *Lipid peroxides and atherosclerosis. Br Med J* 298:281-284, 1989.
10. Yagi K: *Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In Uagi K, ed. Lipid peroxides in biology and medicine. pp 223-42, NewYork, Academic Press, 1980.*
11. Schneir M, Benya P, Bach L: *Determination of malondialdehyde in the presence of sialic acid. Anal Biochem* 35:46-53, 1970
12. Wade CR, Van Rij AM: *Plasma malondialdehyde, lipid peroxides and the thiobarbituric reaction [Letter]. Clin Chem* 35:336 1989
13. Knight JA, Pieper RK, McClellan L: *Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. Clin Chem* 35:2433-2438, 1988.
14. Conti M, Morand PC, Levillain P, Le Monnier A: *Improved fluometric determination of malonaldehyde. Clin Chem* 37:1273-1275, 1991
15. Armstrong D, Al-Awadi F: *Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. Free Radic Biol Med* 11:433-436, 1991
16. Ceridillo A, Crescentini A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E: *Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM Patients. Diabe Care* 20:194-197, 1997
17. Wayner DD, Butron GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ: *The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant*

- activity of human blood plasma. *Biochem Biophys Acta* 924:408-419, 1987
18. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A: *Fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. Free Rad Biol Med* 18:29-36, 1995.
 19. Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, Kato K, Nakazawa S: *Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. Free Radic Biol Med* 15:597-602, 1993
 20. Basu TK, Yze WJ, Leichter J: *Serum vitamin A and retinol-binding protein in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Clin Nutr* 50:329-331, 1989
 21. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A: *Lower plasma peroxyl radical-trapping capacity and higher susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. Diabetes* 43:1010-1014, 1994
 22. McLennan S, Yue DK, Fisher E, Capogreco C, Heffernan S, Ross GR, Turtle JR: *Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. Diabetes* 37:359-361, 1988
 23. Koster JF, Biemond P, Swaak AJ: *Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis* 45:44-46, 1986
 24. Tsan Z.Chin, N, Kiser, MD, Bigler, WN: *Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. Clin Chem* 28:2225-2228, 1982.
 25. Bieri G, Tolliver JJ, Catignani GL: *Simultaneous determination of alpha-tocopherol & retinol in plasma or red blood cells by high pressure liquid chromatography. Am J Clin Nutr* 32:2143-2148, 1979.
 26. Nacitarhan S, Ozben T, Tuncer N: *Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia. Free Radic Biol Med* 19:893-896, 1995
 27. Jain SK: *Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility In human red blood cell. J Biol Chem* 264:21340-21345, 1989
 28. Rungby J, Flyvbjerg A, Andersen HB, Nyberg K: *Lipid peroxidation in early experimental diabetes in rats: Effects of diabetes and insulin. Acta Endocrinol* 126:378-383, 1992
 29. Wolff SP: *The potential role of oxidative stress in the diabetic complications: novel implications for theory and therapy. In Diabetic Complications. Scientific and Clinical Aspects. pp 167, Edinburgh, Churchill Livingston, 1987*
 30. Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Diens KC, Maxfield EK: *Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia* 37:449-459, 1994
 31. Jones AF, Winkles JW, Jennings PE, Florkowski CM, Lunec J, Barnett AH: *Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. Diabetes Res* 7: 89-92, 1988
 32. Stankova L, Riddle M, Lamed J, Burry K, Menashe D, Hart J, Bigley R: *Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. Metabolism* 33:347-353, 1984
 33. Karpen CW, Cataland S, O'Dorisio T, Panganamala R: *Interrelation of platelet vitamin E and thromboxane synthesis in type 1 diabetes mellitus. Diabetes* 33:239-243, 1984
 34. Strain JJ: *Disturbances of micronutrients and antioxidant status in diabetes. Proc Nutr Soc* 50:591-604, 1991