

ω-6 다중불포화지방을 섭취한 백서에서 비타민 E 보충이 인슐린저항성과 산화적 스트레스에 미치는 영향

박선민 · 안승희 · 최미경 · 최수봉*

호서대학교 자연과학대학 식품영양학과, 건국대학교 의과대학 내과학학교실*

The Effect of Vitamin E Supplementation on Insulin Resistance and Oxidative Stress in Sprague Dawley Rats Fed High ω-6 Polyunsaturated Fat Diet

Park, Sunmin · Ahn, Seung Hee · Choi, Me Kyung · Choi, Soo Bong*

Department of Food & Nutrition, College of Natural Science, Hoseo University, ChungNam 337-795, Korea
Department of Internal Medicine,* College of Medicine, KonKuk University, Chung Ju, ChungBuk 143-701, Korea

ABSTRACT

Background: Excessive intakes of ω-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) can increase oxidative stress, which may increase insulin resistance and could be the cause of metabolic syndrome X such as diabetes mellitus. One of the ways to reduce oxidative stress is the consumption of antioxidants such as vitamin E. It is controversial that vitamin E intakes may alleviate insulin resistance. The purpose of the study was whether high vitamin E intake may influence whole body glucose disposal rate(GDR), glycogen deposits, triglyceride content, lipid peroxide levels and antioxidant enzyme activities in Sprague Dawley rats fed high ω-6 PUFA diets.

Methods: Sprague Dawley rats were divided into three groups. The control group consumed chow diet. High and low vitamin E groups consumed 40% PUFA of total energy intakes. One kilogram of diet mixture contained 300IU of α-tocopherol in high vitamin E group, while it had 30 IU in low vitamin E group. Diets were given for 8 weeks. After 7 weeks of diet consumption, indwelling catheters were inserted in carotid artery and jugular vein of all rats so that GDR could be measured in awake and unstressed state. **Results:** Daily PUFA intakes were lower in the control group than others. Daily vitamin E intake of high vitamin E group was about ten times higher than those of low vitamin E group and the control group ($p < 0.0001$). α-tocopherol content in liver was highest in the high vitamin E group. GDR of the control group was 24% higher than others, and vitamin E intakes did not affect GDR. Glycogen deposit of liver in the control group was significantly higher than others, and it was not altered by vitamin E supplementation. Muscle glycogen content showed a similar tendency as liver glycogen in different diet groups. Triglyceride deposit in muscle was not different among groups. Lipid peroxide content of liver in the high vitamin E group was lower than the low vitamin E group. The activities of antioxidant enzymes did not show a consistent effect by vitamin E supplementation: the activities of glutathione peroxidase were lowered in low vitamin E group than others, however, those of superoxide dismutase and catalase were not different. **Conclusions:** High vitamin E intakes can decrease oxidative stress in rats fed high ω-6 PUFA diet, but they cannot alleviate insulin resistance. Thus, increased oxidative stress through high ω-6 PUFA diet may be minimal for influencing insulin resistance. (Korean J Nutrition 32(6) : 644~653, 1999)

KEY WORDS: ω-6 polyunsaturated fat, vitamin E, euglycemic hyperinsulinemic clamp.

서 론

우리나라의 국민 영양 조사 보고에서 연차적인 지방 섭취량의 추이를 보면 1970년도에 8.9%에서 80년도에는 9.6%, 90년도에는 13.9%, 그리고 93년도에는 18.2%로 지방의 섭

채택일 : 1999년 8월 27일

*This work was supported by the Korean Research Foundation.

취 비율이 점차 증가하고 있는 추세에 있다.¹⁾ 93년도 국민 영양조사에서 지역별로 지방 섭취량을 계산하면 대도시, 도시 시골에 거주하는 사람은 각각 총 열량의 19.8, 19.1, 14.2%를 지방으로 섭취하고 있어 지역별로 지방 섭취량에 큰 차이가 있었고, 또한 몇몇 연구논문의 조사에 따르면 여대생은 지방 섭취량이 총 열량의 25% 정도로 매우 높았다.^{2,3)} 또한, 총 지방 섭취량의 약 30% 이상을 ω-6 다중불포화지방으로 섭취하여 식이로부터 섭취한 총 지방의 다중불포화지방 : 포화지방의 비(P : S ratio)가 1 정도로 서구의 값

0.6 보다 현저하게 높다. 포화지방의 과다 섭취는 혈중 콜레스테롤의 농도를 증가시켜 심장혈관계질환등의 여러 질환 발생을 증가시키는 위험요인으로 알려져 있으며, 다중불포화지방의 섭취는 오히려 혈청 콜레스테롤의 농도를 낮춰 심장혈관계 질환의 예방에 좋다고 여겨왔다.^{4,5)}

그러나 최근에는 다중불포화지방 특히, ω -6 다중불포화지방의 과다 섭취가 체내 산화적 스트레스를 증가시켜 인체에 해롭다는 보고가 있다.⁶⁾ ω -6 다중 불포화지방이 산화되면 세포막과 DNA 등이 손상되어 세포에 독성을 나타내어 암, Alzheimer's disease, 인슐린 저항성 증후군 등 다양한 질병을 유발시킬 수 있다고 보고되었다.^{7,8)} 그러나 아직까지 산화적 스트레스가 직접적으로 인슐린 저항성에 미치는 영향에 대한 연구는 적었다. 최근 보고에 따르면 근육 세포내의 ω -6 불포화지방의 비율이 높은 경우에 혈청 공복 인슐린과 증성지방 농도가 증가하였다고 하였고 이러한 현상은 인슐린 저항성의 증가를 반영하는 것이라고 하였다.¹⁰⁾ 세포막에 존재하는 ω -6 다중불포화지방이 인슐린 저항성을 증가시키는 기전에 대해서 하나의 가능한 기전이 보고되었다. ω -6 다중불포화지방이 산화되면 세포막에 존재하는 포도당 운반체인 GLUT4의 활성이 감소하여 포도당의 이동을 감소시키고 또한 세포내의 인슐린 signal transduction에 관여하여 인슐린의 작용력을 감소시켜 인슐린 저항성을 유발시킬 수 있다고 하였다.¹¹⁾

ω -6 다중불포화지방으로 인한 산화적 스트레스를 감소시키는 기전은 항산화제와 항산화 효소에 의한 자유라디칼과 산화물의 제거기전이다.¹²⁻¹⁴⁾ 항산화제 중의 하나인 비타민 E는 세포막이나 지방의 산화를 방지할 수 있는 가장 중요한 지용성 물질로 비타민 E를 충분히 공급하면 다중불포화지방의 산화를 방지할 수 있을 것이다.^{15,16)} 즉, 비타민 E는 자유라디칼을 제거하는 기전을 통해 세포의 다양한 물질이 과산화되는 것을 방지할 수 있다.¹⁶⁾ ω -6 다중 불포화지방과 함께 충분히 비타민 E를 섭취한다면 다중불포화지방의 산화를 방지하여 체내의 산화적 스트레스로 인한 피해를 감소시킬 수 있을 것이다. 그러나 산화적 스트레스의 감소와 인슐린 저항성과의 관계에 대한 연구는 아직까지 많지 않다. 최근 연구에 따르면 항산화제를 공급하여 산화적 스트레스를 감소시키도 인슐린 저항성을 감소시키지 않으므로 산화적 스트레스와 인슐린 저항성과는 관계가 없고 각자 독자적인 기전에 의해서 발생하는 것이라는 보고가 있었다.¹⁸⁾ ω -6 다중불포화지방과 비타민 E의 섭취가 인슐린 저항성의 발생과 지연에 어떠한 영향을 주는지에 대한 연구는 산화적 스트레스와 인슐린 저항성 간의 관계를 밝히는 데에 중요

한 의미가 있겠다. 본 연구의 목적은 ω -6 다중불포화지방을 섭취하는 백서에게 비타민 E를 보충하였을 때 인슐린 저항성의 정도를 나타내는 체내 포도당 대사 속도 및 체내 산화적 스트레스에 미치는 영향을 조사하는 것이었다.

연구 방법

1. 실험동물의 사육

생후 8주 된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 실험동물을 1군에 10마리씩 3군으로 나누고 1 주일간 새로운 환경에 적응시킨 후 한 군은 정상대조군으로, 나머지 두 군은 실험식이인 고비타민 E와 저비타민 E 식이로 8 주 동안 자유급식하고(Fig. 1), 식이 섭취량을 측정하였다. 사육기간 동안 매주 한번씩 오전 11시에 꼬리 끝으로부터 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였고 체중을 측정하였다. 사육실 온도는 20 ± 2°C, 상대습도는 65 ± 5%를 유지하고, 명암주기를 12시간이 되도록 빛을 조절하였다.

2. 실험식이

실험식이는 비타민의 함량에 따라 저비타민 E 군과 고비타민 E 군으로 나누어 8주간 공급하였다. 실험식이는 고불포화지방(High PUFA) 식이로 탄수화물, 단백질과 지방의 구성비는 각각 열량비로 40%, 20%, 40% 이었다.¹⁷⁾ 탄수화물은 corn starch로, 단백질은 casein으로 그리고 불포화 지방은 옥수수 기름으로 공급하였다. 옥수수 기름에는 ω -6 다중 불포화지방인 linoleic acid가 61%를 함유하고 있어 실험식이의 24%를 ω -6 다중불포화지방으로 공급하였다. 무기질은 AIN mineral mixture의 구성비를 이용하고 비타민은 AIN, vitamin mixture 구성비를 이용하였다.¹⁸⁾ 고비타민 E군과 저비타민 E군은 식이내에 함유된 비타민 E의 함량에 따라 나누었는데, 저비타민 E군은 비타민 E 결핍증이 나타나지 않아 생명 유지에 지장을 초래하지 않을 정도의 최소 함량인 30IU α -tocopherol/kg diet mixture를 공급하였다. 비타민 E의 효과를 조사하기 위해서 고비타민 E군은 α -tocopherol을 저비타민 E군의 10배(300 IU/kg diet mixture)를 공급하였다. 정상대조군이 섭취한

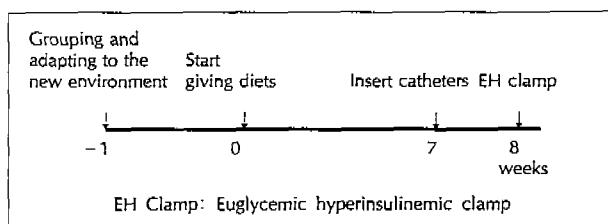


Fig. 1. Experimental design.

고형사료(EP 마우스 사료, 삼양사)는 탄수화물이 60%, 단백질 25%, 지방이 15%이 함유되어 있었고, 이것에는 비타민 mixture와 무기질이 충분히 함유되어 있었다. 고형 사료에 함유된 비타민 E의 함량은 본 실험실에서 측정하였는데 45IU α -tocopherol/kg diet mixture가 함유되어 저비타민 E군과 비슷한 수준이었다.

3. Euglycemic hyperinsulinemic clamp study

실험동물을 회생시키는 전에 euglycemic hyperinsulinemic(EH) clamp 방법에 의해서 인슐린 저항성을 측정하기 위하여 실험식이를 공급한지 7주째 되었을 때 phenobarbital을 근육 주사하여 마취시킨 후 왼쪽 carotid artery와 오른쪽 jugular vein에 catheter를 삽입하였다.¹⁹⁾ Catheter 삽입 수술 후에 백서에게 각 군의 실험식이와 물을 정상적으로 공급하였고, 1주일 후에는 체중이 수술 전보다 증가하기 시작하며 수술로부터 완전히 회복하였다. 수술 7일 째 되는 날에 약 15~18시간 금식시킨 후 인슐린 저항성을 측정하였다.

EH clamp를 할 때 백서의 왼쪽의 jugular vein에 삽입한 catheter로 포도당과 인슐린을 주입하고, 오른쪽의 carotid artery로부터 혈액을 채취하여 혈당이 정상 혈당을 유지할 때의 주입되는 포도당 농도로부터 체내 포도당 처리 속도를 결정하여 인슐린 저항성을 계산하였다. 즉, 실험동물의 한배에서 나온 백서에게서 heart puncture로 얻은 혈액을 헤파린 처리한 생리 식염수로 1 : 1(v : v)로 희석한 용액에 인슐린을 섞어 12mU/kg/min 속도로 인슐린을 지속적으로 주입하였다. 이와 동시에 25% 포도당 용액을 정맥으로 주입하여 EH clamp를 시작한지 약 90분이 지나면 혈당이 5.0~5.6mmol/L인 정상혈당으로(euglycemia) steady-state를 유지하는데 이렇게 혈당이 euglycemia를 유지할 때의 포도당 주입속도로부터 체내 포도당 처리 속도를 결정하였다. 체내 포도당 처리속도는 혈당을 5.0~5.6 mmol/L로 유지하는 포도당 주입속도와 주입하는 용액의 포도당 농도를 곱하고 백서의 체중으로 나누어서 분당 단위 체중 당 처리되는 포도당 함량으로 계산하였고, 단위는 mg/kg body weight/minute이다.²⁰⁾²¹⁾

채취한 혈액은 원심분리로 혈청을 분리한 후 혈당 분석기(Glucose Analyzer, Beckman Instruments, Fullerton, CA)로 혈당을 측정하였다. 혈청 인슐린 농도는 euglycemic hyperinsulinemic clamp 중 시작 전, 90분과 120분에 측정하였다. 혈청 인슐린 농도는 Rat Insulin Specific RIA kit(Linco Research Inc., St. Charles, USA)을 이용하여 radioimmunoassay 측정하였다.²²⁾

EH clamp가 끝나자마자 바로 pentobarbital(20mg/kg)을 정맥으로 주입하고, 간, 골격 근육인 soleus와 지방 조직을 분리하여 액체 질소에 넣어 즉각 동결시켜 생화학적 실험을 할 때까지 -70°C에 보관하였다가 분석에 이용하였다.

4. 생화학적 분석

혈청내의 지용성 항산화제의 보유상태를 조사하기 위해서 혈청에서 α -토코페롤과 γ -토코페롤을 추출하여 그 농도를 fluorescence detector에 의한 HPLC를 이용하여 측정하였다.¹⁷⁾ 간과 근육의 glycogen 함량은 일정량의 간과 근육을 균질화시킨 직후에 포도당 농도를 측정하고, 거기에 glucoamylase를 첨가하여 배양시킨 후 포도당 농도를 측정하여, 간과 근육에 glycogen으로 저장된 포도당의 함량을 결정하였다.²³⁾ 근육에 함유된 중성지방의 함량은 일정량의 근육에 chloroform : methanol(2 : 1, v : v)을 넣어 homogenizer로 균질화시킨 후 vortex를 하여 근육으로부터 지방을 추출하였다. 여기에 NaCl 용액을 넣어 중성지방이 함유되어 있는 chloroform 층을 분리하였다. 이층에 함유되어 있는 중성지방 함량은 영동제약 kits를 이용하여 500nm에서 비색정량하였다.²⁴⁾

간 조직에 함유된 과산화지질의 농도는 간 조직을 TBS buffer로 균질화시킨 후 1/12N 황산과 10% phosphotungstic acid를 넣어 단백질을 제거하고 thiobarbituric acid reagent(TBA)를 첨가하여 TBA와 반응하는 TBA substance의 농도를 spectrophotometer(Pharmacia)로 532nm에서 비색정량하여 결정하였다.²⁵⁾

간조직의 catalase 활성은 Johansson과 Hakan Borg 법에 의하여 측정하였다. 간조직을 Tris-1mM EDTA buffer(pH 7.4)로 균질화시킨 후 phosphate buffer(pH 7.0)로 희석하여 catalase 활성을 측정하고, formaldehyde를 표준용액으로 하여 spectrophotometer(Pharmacia)로 550nm에서 흡광도를 측정하여 분당 활성을 계산하였다.²⁶⁾ 간조직의 superoxide dismutase의 활성은 pyrogallol의 산화 방법을 변형하여 측정하였다.²⁷⁾²⁸⁾ 이 효소의 활성의 1 unit은 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는데 필요한 혈청 양으로 결정하였다. Cytochrome C(Fe^{+++})의 환원을 50% 방해하는 SOD량을 1 Unit으로(이를 흔히 MaCord and Fridovich Unit라 한다.) 정하여 분당 활성 정도를 나타내었다. 간조직내의 glutathione peroxidase(GSHPx) 활성은 Flohe와 Gunzler의 방법을 이용하였다. GSHPx는 H_2O_2 와 glutathione(활원형, GSH)의 반응에 관여하여 glutathione(산화형, GSSG)를 생성하며 이 GSSG은 glu-

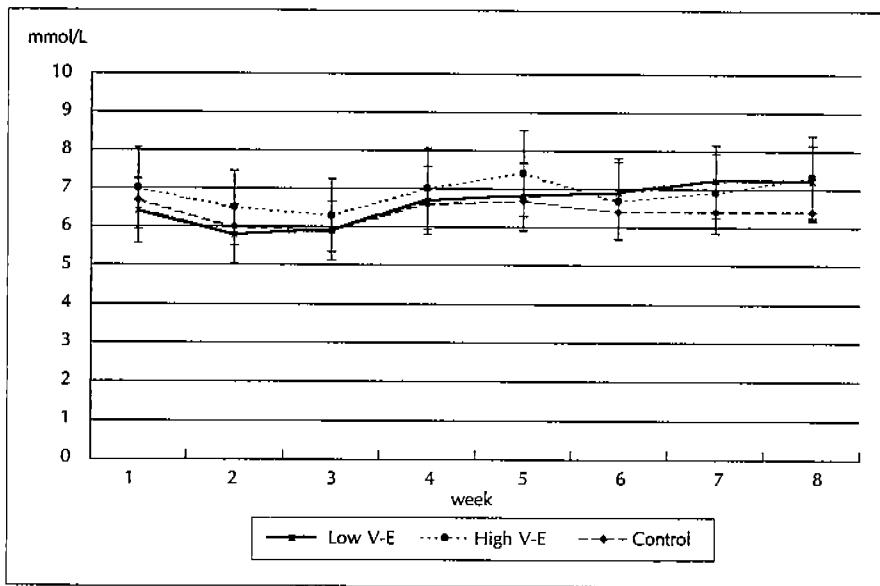


Fig. 2. Changes of serum glucose concentrations.

tathione reductase의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원된다. 이 원리를 이용하여 GSHPx의 활성을 분당 산화된 NADPH의 nmole로 나타내었다.²⁹⁾ 간 조직의 단백질 농도는 Lowry 법으로³⁰⁾ 측정하였다.

5. 통계적 처리

백서에게 고다증불포화지방 식이에 비타민 E를 두 수준으로 나누어 8주 동안 공급한 후 측정한 다양한 변수의 수치를 각 군별로 평균과 표준 편차를 계산하였다. 비타민 E 첨가의 효과는 측정한 각각의 변수에 대해서 t-test와 분산분석 (one-way analysis of variance)으로 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리의 유의성 검증은 $\alpha = 0.05$ 로 정하였다.

연구 결과

1. 체중과 혈당의 변화

실험 동물은 식이의 종류에 관계없이 유사한 체중 증가를 나타내었다(Table 1). 식이내 비타민 E의 함량에 관계없이 두군의 체중은 1주일에 평균 20g 정도씩 증가하였다.

실험식이를 공급하기 전의 백서의 공복 혈당은 평균 6.2 ~7.5mmol/L이었고, 이들의 공복 혈청 인슐린 농도는 637.5 ± 185pmol/L로 세군 사이에 차이가 없었다. 실험식이를 공급한 후에 혈당은 큰 차이는 없었지만 정상대조군에 비해 고지방 식이를 하는 실험동물의 혈당이 높아지는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 또한, 비타민 E의 첨가에 따른 혈당과 혈청 인슐린 농도의 변

Table 1. Changes of body weight

	Low vitamin (n = 9)	High vitamin (n = 9)	Control (n = 10)
1 week	193 ± 45	185 ± 49	193 ± 42
2 week	229 ± 54	223 ± 48	226 ± 50
3 week	249 ± 62	245 ± 59	247 ± 55
4 week	280 ± 69	278 ± 72	280 ± 70
5 week	295 ± 73	296 ± 68	295 ± 69
6 week	315 ± 78	322 ± 76	315 ± 77
7 week	348 ± 79	348 ± 85	348 ± 89
8 week	365 ± 84	375 ± 83	370 ± 88

Data expressed as mean ± standard deviation

Table 2. Daily nutrient Intakes in experimental diets

	Low V-E	High V-E	Control
Calorie (kcal)	115.8 ± 8.7	111.9 ± 12.2	110.8 ± 10.6
Carbohydrate (g)	8.9 ± 1.5 ^a	8.7 ± 2.1 ^a	16.4 ± 2.8 ^{b***}
Protein (g)	4.1 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.5 ^a	6.5 ± 0.4 ^{b*}
Lipid (g)	4.6 ± 0.5 ^b	4.5 ± 0.6 ^b	1.7 ± 0.3 ^{****}
Vitamin E (IU)	1.2 ± 0.4 ^a	11.5 ± 1.3 ^b	1.8 ± 0.5 ^{a***}

Data expressed as mean ± standard deviation

***There were significant differences among the diet groups at $\alpha = 0.001$

*There were significant differences among the diet groups at $\alpha = 0.05$
a, b: Values on the same column with different superscripts(a, b)
were significantly different at $\alpha = 0.05$

화는 없었다.

2. 식이 섭취량

각군의 백서가 섭취한 열량, 단백질, 지방, 비타민 E 함량은 Table 2에 있다. 저비타민 E군이 하루에 섭취한 비타민

E 함량은 평균 1.2IU로 실험동물이 결핍증을 나타내지 않을 최소한의 양을 공급하였다. 그러나 이 양은 고불포화지방 식이로 인한 산화적 스트레스를 충분히 해소시킬 수 있는 함량은 아니었다. 정상대조군에 공급한 고형 사료에는 저지방 식이를 하였을 때의 일일 필요량을 충족시킬 만큼의 비타민 E가 함유되어 있었다. 정상 대조군, 고비타민 E군과 저비타민 E군의 일일 비타민 E 섭취량은 각각 1.8 ± 0.5 IU, 11.5 ± 1.5 IU과 1.2 ± 0.1 IU이었다.

3. 간에 저장된 비타민 E 함량

백서에서 고비타민 E 식이를 공급하였을 때 저비타민 E 식이를 공급하였을 때에 비해 간에 저장된 α -tocopherol의 함량이 높았다($p < 0.05$). γ -tocopherol 함량은 정상대조군에 비해 고비타민 E 식이를 섭취한 군에서 높았고($p < 0.05$), 저비타민 E 식이를 섭취한 군에서도 정상대조군보다는 높았지만 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 이것은 실험식이는 고지방 식이로 정상대조군에서 섭취한 고형사료보다 지방 함량이 많았고, 본 연구에서 사용한 지방은 옥수수 기름이었는데 옥수수 기름에는 γ -tocopherol의 함유량이 높기 때문으로 여겨진다(Fig. 3).

4. 체내 포도당 제거 속도

체내 포도당 제거 속도는 체내의 인슐린 저항성 정도를 나타내는 것으로 포도당 제거속도가 높을수록 인슐린 저항성이 적은 것을 의미한다. 체내 포도당 처리 속도를 측정하는 EH clamp를 하기 전에 체중, 공복 혈당과 인슐린 농도는 식이에 따른 차이가 없었다(Table 2). 공복 혈당은 비타민 E의 보충에 따른 효과가 없어 고비타민 E군에서 7.3 ± 1.6 mmol/L이었고, 저비타민 E군에서 7.2 ± 1.5 mmol/L로 차이가 없었다. 정상대조군의 공복혈당은 실험식이를 섭취한 군에 비해 낮은 경향을 나타내었으나 통계적으로 유

의한 차이는 아니었다. 공복 혈청 인슐린 농도도 식이에 비타민 E의 첨가에 따른 차이는 없었지만, 실험식이를 섭취한 군의 값이 정상대조군보다는 높은 경향을 나타내었다. 모든 실험동물에서 EH clamp를 시작하여 90분이 지난 후 혈당은 euglycemia에 도달하였고 이때 평균 혈청 인슐린 농도는 2978 ± 978 pmol/L이었다. 체내 포도당 제거 속도는 식이내 비타민 E의 첨가에 따른 차이는 없었다(Fig. 4). 그러나 정상대조군의 포도당 제거 속도는 실험식이를 섭취한 백서에 비해 약 24% 높았다($p < 0.05$). 이러한 차이는 정상 대조군의 식이가 실험식이에 비해 저지방식이었기 때문으로 여겨진다.

5. 간과 근육에 저장된 glycogen과 근육에 저장된 중성지방 함량

정상대조군에서 간에 저장된 glycogen 함량은 52.2 ± 13.7 mg/g tissue로 고지방 식이를 기본으로 한 실험식이에 비해(45.4 ± 11.6 mg/g tissue) 높았다($p = 0.05$, Fig. 5). 실험식이 군에서 비타민 E의 첨가에 따른 간에 저장된 glycogen 함량에 차이는 없었다. 근육에 저장된 glycogen의 함량은 간에 저장된 glycogen 함량과 유사한 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다.

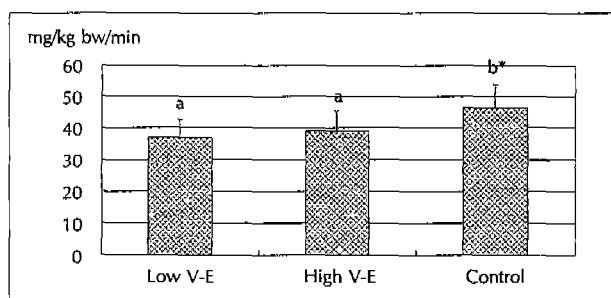


Fig. 4. Whole body glucose disposal rate.

*There were significant differences among the diet groups at $\alpha = 0.05$.
a,b: Significantly different between a and b at $\alpha = 0.05$.

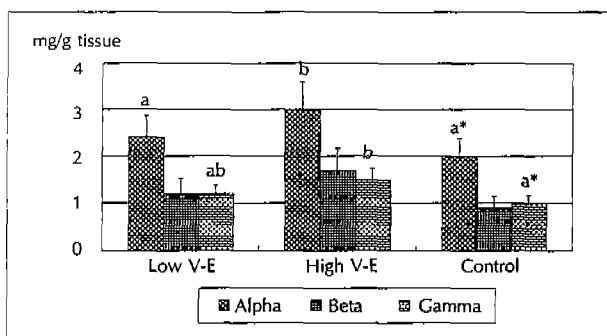


Fig. 3. α -, β -, & γ -tocopherol in liver.

*There were significant differences in α - and β - tocopherols among the diet group at $\alpha = 0.05$.

a,b: Significantly different between a and b at $\alpha = 0.05$.

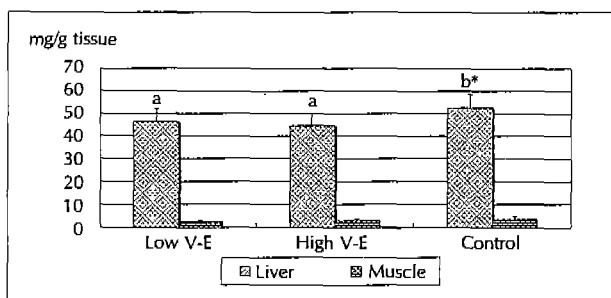


Fig. 5. Glycogen concentrations in liver and muscle.

*There were significant differences in liver glycogen among the diet group at $\alpha = 0.05$.

a,b: Significantly different between a and b at $\alpha = 0.05$.

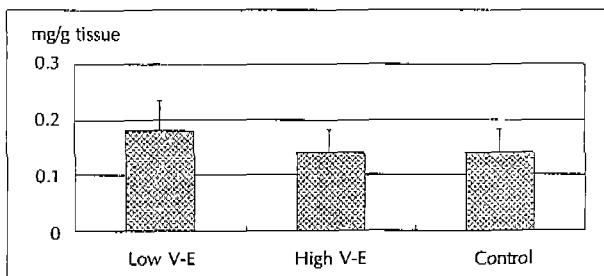


Fig. 6. Muscle triglyceride concentrations.

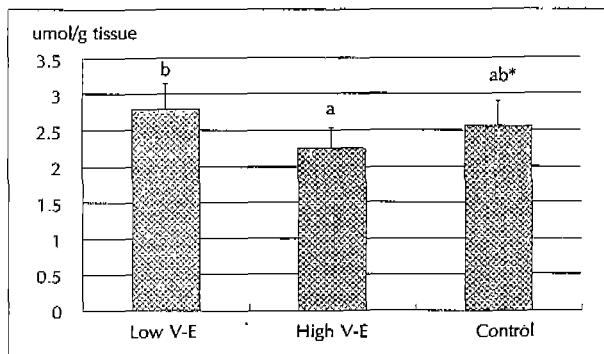


Fig. 7. Lipid peroxide levels in liver.

*There were significant differences among the diet groups at $\alpha = 0.05$.
a,b: Significantly different between a and b at $\alpha = 0.05$.

근육에 저장된 중성지방의 함량은 식이내 비타민 E의 첨가에 따른 유의적인 차이는 없었다(Fig. 6).

6. 간 조직의 과산화지질 함량과 항산화효소 활성

간조직내의 과산화지질 함량은 비타민 E를 첨가한 식이에서 첨가하지 않은 식이에 비해 낮았고, 이것은 비타민 E가 체내에서 불포화지방의 과산화를 방지하는 작용을 하였기 때문으로 여겨진다. 정상대조군의 과산화지질 함량은 실험식이와 유의적인 차이는 없었지만, 고지방을 섭취하면서 비타민 E를 첨가한 경우보다는 높았고, 비타민 E를 첨가하지 않은 경우보다는 낮았다(Fig. 7).

간조직내의 항산화효소인 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase의 활성은 비타민 E를 보충하였을 때 서로 다른 결과를 나타내었다. 간조직내의 glutathione peroxidase는 비타민 E를 첨가한 식이에서 다른 군에 비해 낮았다($p < 0.05$). 그러나 superoxide dismutase와 catalase의 활성은 비타민 E의 보충에 따른 차이가 없었다(Table 3).

고 찰

인슐린 저항성은 제2형 당뇨병뿐 아니라 고혈압과 비탄

Table 3. Body weight and plasma glucose and insulin concentrations at basal and steady state of euglycemic hyperinsulinemic clamp

	Low V-E	High V-E	Control	
Body weight (g)	362.8 ± 85.4	375.4 ± 86.9	370.8 ± 85.4	
Basal	Glucose (mmol/L)	7.2 ± 1.6	7.3 ± 1.6	6.4 ± 1.6
	Insulin (pmol/L)	720 ± 156	768 ± 364	630 ± 156
Steady-state	Glucose (mmol/L)	5.3 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.3 ± 0.1
	Insulin (pmol/L)	2856 ± 1236	3272 ± 1164	2886 ± 1036

Data expressed as mean ± standard deviation

Table 4. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase activities in liver

	Superoxide dismutase (units/mg protein)	Glutathione peroxidase (nmole NADPH/mg protein/min)	Catalase (H_2O_2 nmole/mg protein/min)
Low V-E	43.9 ± 11.2	502.5 ± 28.5 ^b	624.5 ± 64.3
High V-E	50.3 ± 9.6	445.8 ± 29.3 ^a	603.5 ± 92.5
Control	48.7 ± 8.9	498.6 ± 30.6 ^{ab*}	632.4 ± 85.7

Data expressed as mean ± standard deviation

*There were significant differences among the diet groups at $\alpha = 0.05$.
a, b: Values on the same column with different superscripts(a, b) were significantly different at $\alpha = 0.05$

등에서 공통적으로 나타나는 현상이며 이러한 질환의 근본적인 원인이라고 알려져 있다. 인슐린 저항성이 유발되는 기전을 이해하면 이러한 질환을 치료하는데 결정적으로 중요한 단서가 될 수 있다. 인슐린 저항성을 증가시키는 요인으로 알려진 것 중의 하나가 과다한 지방 섭취이다. 과다한 지방 섭취는 혈중 유리지방산의 농도를 증가시키고, 밀초조직에서 포도당의 이용이 감소하는 등 인슐린 작용력을 감소시켜 인슐린 저항성을 증가시킬 수 있다고 하였다.³¹⁾ 서구에서는 포화지방의 섭취가 높아 이에 대한 연구가 많이 이루어졌으나,³¹⁾³²⁾ 다중불포화지방의 섭취는 높지 않아 이에 대한 문제점이 심도있게 제기되지 않았다. 한편, 다중 불포화지방의 섭취는 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시켜 심장혈관계질환의 발생을 감소시킬 수 있으므로 다중불포화지방의 섭취를 권장하였다. 그러나 다중불포화지방의 과다 섭취는 산화적 스트레스를 증가시켜 암 등의 유발을 촉진시킬 수 있다는 것이 밝혀져³³⁾ 현재에는 다중불포화지방의 섭취도 포화지방과 비슷한 양으로 섭취를 제한하도록 권장하고 있다.

다중 불포화지방이 포화지방과 다른 점은 분자내에 불포화기가 존재하여 산화되기 쉬운 점인데, 다중 불포화지방이 인슐린 저항성을 증가시킬 수 있는 기전 중의 하나로서 산화적 스트레스의 증가를 들 수 있다. 다중 불포화지방은 산

화되기 쉬우므로 자유라디칼의 생성을 증가시키고 특히 세포막에 존재하는 다중 불포화지방의 산화를 항진시켜 세포를 손상시키고, 세포내에서의 대사를 비정상적으로 만들어 인슐린 저항성을 일으킬 수 있다. 체내에는 생성된 자유라디칼을 제거하는 기전이 있는데 그 중 하나는 항산화제인 비타민 E, 비타민 C, glutathione 등 다양한 물질로 이들은 세포내에 존재하는 자유라디칼이 더 이상 증폭되지 않도록 제거하는 역할을 한다.³³⁾ 또 다른 기전은 항산화 효소에 의한 것으로 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등이 있고, 이들도 자유라디칼이나 과산화물을 제거하는 반응을 촉매하여 이들을 제거하는 역할을 한다.

ω -6 불포화지방 식이, 산화적 스트레스와 인슐린 저항성 간의 상관관계에 관한 연구를 보면 포화지방의 과다 섭취뿐만 아니라 다중불포화지방 중 ω -6 다중불포화지방산의 과다 섭취도 인슐린 저항성을 증가시킬 수 있다는 적은 수의 보고가 있었지만,³³⁾³⁴⁾ 그 기전에 대한 연구는 없었다. Simopoulos는 linoleic acid의 섭취는 근육 세포막의 인지방에 linoleic acid의 비율을 증가시키고 이는 인슐린 저항성을 증가시켰다고 보고하였다.³⁵⁾ 한편, 다중불포화지방의 종류에 따라 차이가 있어 생선유와 같이 ω -3 다중불포화지방산이 많이 함유된 지방은 인슐린 저항성 증후군의 발생을 감소시켰다는 보고가 있어³⁶⁾ ω -6 다중불포화지방산과는 다른 역할을 할을 보고하였다.

다중 불포화지방의 섭취와 산화적 스트레스와의 관계에 관한 연구는 많다.³⁷⁾⁴⁰⁾ 다중 불포화지방의 섭취는 세포막의 다중불포화지방의 양을 증가시켜 자유라디칼의 공격을 받아 쉽게 과산화되어 산화적 스트레스가 증가한다는 여러 보고가 있다. 식이내 지방이 세포막의 산화를 증가시키는데 조직에 따른 특이성이 존재한다는 보고가 있다.³⁷⁾³⁸⁾ Skuardottir 등은³⁷⁾ 옥수수기름에 비해 생선기름을 섭취하였을 때 세포막의 과산화가 더 심했고 생선유에 많이 함유된 n-3 다중 불포화지방을 섭취하였을 때 백서의 심장 세포막에 비해 간의 세포막의 과산화가 높았다고 보고하였다. 이러한 다중 불포화지방의 과산화를 방지 또는 억제하는 물질로서 비타민 E와 같은 항산화제의 섭취에 대한 여러 연구가 있다.³⁹⁾⁴²⁾ Palozza 등의 보고에 의하면³⁹⁾ 사람에게 n-3 다중 불포화지방을 장기간 섭취시키면서 비타민 E를 보충하였을 때 적혈구 세포막에 함유된 비타민 E의 함량이 감소하였고 이는 다중불포화지방을 장기간 섭취하면 비타민 E를 보충하여도 지방이 과산화되기 쉽다는 것을 보여주는 것이라고 할 수 있다. 이것은 본 연구에서 저비타민 E군에 비해 비타

민 E를 10배 이상 공급한 고비타민 E군에서 간세포막에 존재하는 비타민 E의 함량은 10배 이상 높지 않았던 것과 같은 맥락이라고 할 수 있을 것이다. Wiseman 등은⁴⁰⁾ 총 열량의 30%를 지방으로 그리고 그 지방 중 1/4를 linoleic acid로 공급하고 비타민 E를 4단계로 나누어 공급하였을 때 비타민 E의 섭취가 15배 이상 증가하였을 경우 혈청과 적혈구의 비타민 E 농도는 2배 정도만 증가하였고, 과산화지질의 양은 차이가 없었다고 보고하였다. 그러므로 식이 1kg당 49IU를 공급하면 체내 항산화상태를 유지하는데 충분하다는 것을 보여주는 것이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 저비타민 E군에 비해 고비타민 E군의 간의 과산화지질 함량이 높았는데 이것은 식이내 총 지방량과 다중 불포화지방의 함량이 높아 본 연구에서 공급한 식이 1kg 당 30IU를 공급한 것은 항산화작용을 충족시키지 못했던 것으로 여겨진다.

비타민 E가 인슐린 저항성에 미치는 영향에 대한 연구는 여럿 있는데 그 결과는 일관성이 없었고, 특히 ω -6 다중불포화지방산을 과다로 공급하였을 때 비타민 E가 인슐린 저항성에 미치는 효과에 관한 연구는 없었다. 본 연구 결과에서는 ω -6 다중불포화지방을 과다 섭취하는 백서에서는 적게 섭취하는 백서에 비해 체내 포도당 처리 속도가 감소되었다. 고불포화지방 식이를 섭취하는 백서에게 비타민 E를 보충하였을 때 체내 포도당 처리 속도에 영향을 미치지 않았다. 간에 저장된 glycogen의 함량이 실험식이를 공급한 백서에 비해 정상대조군에서 높았다. 근육에 저장된 glycogen의 함량도 간에 저장된 glycogen의 함량과 유사한 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. Skrha 등은 인슐린 저항성이 높은 비만인 제2형 당뇨병 환자에게 비타민 E를 일일에 600mg씩 3개월 동안 복용시켰을 때 비타민 E를 복용하기 전보다 Hb A_{1c}의 농도도 증가하였고, 체내 포도당 처리 속도가 현저하게 감소하여 비타민 E의 공급이 오히려 인슐린 저항성을 증가시켰다고 보고하였다.⁴³⁾ 반면에 Paolisso 등은 건강한 사람과 당뇨병 환자를 대상으로 일일에 900mg의 비타민 E를 2개월 동안 공급하였을 때 비타민 E를 섭취하기 전에 비해 섭취 후에 포도당 제거 속도가 증가하였다고 보고하였다.⁴⁴⁾ Facchini 등은 건강한 사람에게 항산화 비타민인 비타민 A(3700RE/day), E(90mg/day)와 C(560mg/day)를 과량으로 공급하였을 때 포도당 처리 속도에 미치는 영향을 조사하였다.⁴⁵⁾ 이 조사대상자들은 총열량의 약 34%를 지방으로 섭취하였고, P : S ratio는 0.57로 포화지방을 다중불포화지방의 약 2배 더 섭취하였다. 이 결과에서는 비타민 A만이 포도당 제거속도를 증

가시켰고, 지방, 비타민 E와 C는 포도당 제거 속도에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. Faure 등은⁴⁶⁾ 백서에게 식이의 34%를 과당으로 공급하고, 1kg 식이당 3.4g의 비타민 E를 첨가하거나 첨가하지 않았을 때, 정상군에 비해 식이내 과당을 34% 함유군에서는 비타민 E의 첨가 여부에 관계없이 인슐린 민감성이 감소하였고, 고과당식이에서는 비타민 E 첨가군이 비첨가군에 비해 인슐린 민감성이 증가하였다고 하였다. 이와 같이 비타민 E의 섭취가 인슐린 민감성에 미치는 영향은 연구마다 그 결과가 일치하지 않았다. 비타민 E가 체내에서 포도당의 이용이나 포도당 제거 속도에 영향을 미치는 기전에 대한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 일일 비타민 E의 권장량은 다중 불포화지방의 섭취가 증가함에 따라 증가시키는 것이 체내 산화적 스트레스를 감소시키는데 바람직하지만, 인슐린 저항성을 감소시키지 못했으므로 한국 당뇨병 환자에게 비타민 E를 권장량 이상으로 섭취하도록 추천하는 것은 바람직하지 않다고 생각된다.

결론적으로 정상 백서에게 고다중불포화지방 식이를 공급하면서 비타민 E를 보충하였을 때 비타민 E를 보충하지 않았을 경우에 비해 산화적 스트레스가 감소하였다. 그러나 비타민 E의 보충이 항산화 효소 중 glutathione peroxidase의 활성을 오히려 감소시키고, superoxide dismutase와 catalase 활성에는 영향을 미치지 않았으므로, 비타민 E를 보충하였을 때 산화적 스트레스의 감소는 비타민 E가 자유라디칼을 제거하여 과산화지질의 생성을 감소시켜 나타난 것이지 비타민 E가 항산화 효소에 활성에 영향을 주어서 야기된 것은 아닌 것으로 여겨진다. 한편, 비타민 E의 보충자체가 체내 포도당 제거 속도에 영향을 미치지 않은 것으로 보아 다중 불포화지방으로 인한 체내 산화적 스트레스의 증가가 인슐린 저항성에 미치는 영향은 미미한 것으로 여겨진다. 또한 다중불포화지방의 섭취가 인슐린 저항성을 증가시키는 것은 주로 간이나 근육에 저장되는 글리코겐의 양의 감소와 상관관계가 있는 것으로 보여진다.

요약 및 결론

배경 :

ω -6 다중불포화지방의 과다 섭취는 산화적 스트레스를 증가시킬 수 있고 이는 인슐린 저항성을 증가시켜 다양한 질병 특히 metabolic syndrome X를 유발할 수 있을 것이다. 산화적 스트레스를 감소시키는 방법 중의 하나가 비타민 E와 같은 항산화제를 섭취하는 것인데 이러한 항산화제

의 섭취가 인슐린 저항성에 미치는 영향에 대해서는 아직 논란이 많다. 따라서 본 연구에서는 고다중불포화지방 식이를 하는 정상 백서에서 비타민 E의 보충이 인슐린 저항성과 산화적 스트레스에 미치는 영향을 조사하였다.

방법 :

생후 8주된 Sprague Dawley 백서를 한군에 10마리씩 세 군으로 나누어 한군은 고형사료로 사육하는 정상대조군으로 하고, 나머지 두군은 총 열량의 40%를 지방으로 공급하고, 총 지방 중 60%가 ω -6 다중 불포화지방산인 linoleic acid로 공급하였다. 이러한 고지방 식이로 공급하는 두 군 중의 한군은 고비타민 E 식이(식이 kg당 300IU)를 공급하고 나머지 한군은 저비타민 E 식이(식이 kg당 30IU)를 공급하여 8주 동안 사육하였다. 7주째 모든 실험 동물에게 동맥과 정맥에 catheter를 삽입하고, 수술로부터 완전히 회복한 7일째에 12시간 금식 후 hyperinsulinemic eu-glycemic clamp 실험을 실시하였다.

결과 :

정상대조군에 비해 고지방의 실험식이 군들이 하루에 섭취한 다중불포화지방 양이 현저하게 높았다($p < 0.0001$). 일일 비타민 E 섭취량은 저비타민 E군이 1.2 ± 0.4 mg이었고, 고비타민 E 군은 11.5 ± 1.3 mg을 섭취하여 두 군 사이에 현저한 차이가 있었다($p < 0.001$). 정상대조군에 비해 고다중불포화지방 식이를 섭취하는 실험식이군의 포도당 제거속도(glucose disposal rate, GDR)이 24% 낮았고($p < 0.05$), 비타민 E의 보충에 따른 GDR의 차이는 없었다. 정상대조군에 비해 간에 저장된 비타민 E 함량은 고비타민 E 식이를 섭취하였을 백서에서 저비타민 E 식이를 한 백서의 경우보다 높았다($p < 0.05$). 간에 저장된 glycogen 함량은 정상대조군에서 실험식이에 비해 높았지만($p = 0.05$), 비타민 E의 보충에 따른 차이는 없었다. 간의 과산화지질 함량은 고비타민 E 식이를 하였을 때 저비타민 E 식이를 하였을 경우 보다 비해 낮았다. 비타민 E의 보충에 따른 항산화 효소의 효과는 일관성이 없어 glutathione peroxidase 활성을 고비타민 E 식이를 하였을 때 낮아졌으나, superoxide dismutase와 catalase의 활성은 차이가 없었다.

결론 :

백서에게 고다중불포화지방 식이를 공급하면서 비타민 E를 보충하였을 때 비타민 E는 생성되는 자유라디칼을 제거하여 체내 산화적 스트레스를 감소시킨다. 그러나 비타민 E의 보충은 체내 포도당 제거 속도에 영향을 미치지 않은 것으로 보아 다중 불포화지방으로 인한 체내 산화적 스트레

스의 증가가 인슐린 저항성에 미치는 영향은 적은 것으로 여겨진다.

Literature cited

- 1) Ministry of Health and Welfare. 93 National Nutrition Survey Report, 1995
- 2) Park S, Yu JG. Relationship among apolipoprotein E phenotypes, dietary fat, serum lipoprotein concentrations and erythrocyte membrane fatty acid composition in young health women. *Kr J Nutr* 29: 1021-1030, 1996
- 3) Oh SY, Lee HY, Paik HY. Comparison of the levels of nutrient intakes by different dietary methods and days of dietary studies among young females in Korea. *Kr J Nutr* 29: 1021-1027, 1996
- 4) Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Muesing RA, Chen SC, Weststrate JA, Meijer GW, Witten J, Lichtenstein AH, Vilella-Bach M, Schaefer EJ. Effects of margarine compared with those of butter on blood lipid profiles related to cardiovascular disease risk factors in normolipemic adults fed controlled diets. *Am J Clin Nutr* 68: 768-777, 1998
- 5) Sanders TA, Oakley FR, Miller GJ, Mitropoulos KA, Crook D, Oliver MF. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3449-3460, 1997
- 6) Stroll DA. Essential fatty acids, insulin resistance, and breast cancer risk. *Nutr Cancer* 31: 72-79, 1998
- 7) Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl* 21(3): 154-62, 1998
- 8) Galli C, Marangoni F. Recent advances in the biology of n-6 fatty acids. *Nutrition* 13(11 - 12): 978-985, 1997
- 9) Chen L, Bowen PE, Berzy D, Aryee F, Stacewicz-Sapuntzakis M, Riley RE. Diet modification affects DNA oxidative damage in healthy humans. *Free Radic Biol Med* 26(5 - 6): 695-670, 1999
- 10) Baur LA, O'Connor J, Pan DA, Storlien LH. Relationships between maternal risk of insulin resistance and the child's muscle membrane fatty acid composition. *Diabetes* 48(1): 112-116, 1999, Jan
- 11) Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 274(15): 10595-10560, 1999, Apr 9
- 12) Parthiban A, Vijayalingam S, Sharunugasundaram KR, Mohan R. Oxidative stress and the development of diabetic complications—antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. *Cell Biol Int* 19: 987-993, 1995
- 13) Gallova J, Abuja PM, Pregetter M, Laggner P, Prassl R. Site-specific effect of radical scavengers on the resistance of low density lipoprotein to copper-mediated oxidative stress: influence of alpha-tocopherol and temperature. *Chem Phys Lipids* 92: 139-149, 1998
- 14) Reaven PD, Barnett J, Herold DA, Edelman S. Effects of Vitamin E on susceptibility of Low-Density Lipoprotein and Low-density Lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM. *Diabetes Care* 18: 6-13, 1995
- 15) Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 52: 253-265, 1994
- 16) Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Glycation, oxidative stress and scavenger activity: Glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes* 45(Suppl. 3): S84-S86, 1996
- 17) American Diabetic Association. Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 18: 19-28, 1995
- 18) Report of the American Institute of Nutrition. Ad Hoc committee on standard for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348, 1977
- 19) Waynfirth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical technique in the rat. 2nd ed, pp.212-216, New York, Academic press, 1994
- 20) Rossetti L, Farrace S, Choi SB, Giaccari A, Sloan L, Frontoni S and Katz MS. Multiple metabolic effects of CGRP in conscious rats: Role of glycogen synthase and phosphorylase. *Am J Physiol* 264: E1-E10, 1993
- 21) Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and w-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 40: 280-289, 1991
- 22) Morgan CR, Lazarow A. Immunoassay of insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes* 12: 115-126, 1963
- 23) Motchnik A, Frei B, Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Meth Enzymol* 234: 269-279, 1994
- 24) Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vugrin P, Chen W, Hawkins M, Wu J, Wang J. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem* 272: 27758-27766, 1997
- 25) Hopp JF, Palmer WK. Effect of glucose and insulin on triacylglycerol metabolism in isolated normal and diabetic skeletal muscle. *Metabolism* 40: 223-234, 1991
- 26) Yagi K. Assay for blood, plasma or serum lipid peroxide levels. In Methods in enzymology. Academic Press 105-111: 328, 1984
- 27) Pereira B, Costa Rosa LFB, Safi DA, Bechara EJH, Curi R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs of diabetic rats. *J of Endocrin* 142: 161-165, 1994
- 28) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969
- 29) Floe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Meth Enzymol* 105: 93-104, 1984
- 30) Floe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 105: 114-121, 1984
- 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-277, 1951
- 32) Park KS, Lee KU, Park SW, Lee HK. Time-dependent effects of high fat diets on insulin resistance in rats. *Kr Diabetes* 21: 168-175, 1997
- 33) Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high fat fed rats. *Diabetes* 40: 1397-1403, 1991
- 34) Chen H, Tappel AL. Protection of vitamin E, selenium, trolox C, ascorbic acid palmitate, acetylcysteine, coenzyme Q0, coenzyme Q10, betacarotene, canthaxanthin, and (+)-catechin against oxidative damage to rat blood and tissue in vitro. *Free Radic Biol Med* 18: 949-953, 1995
- 35) Simopoulos AP. Is insulin resistance influenced by dietary linoleic acid and trans fatty acids? *Free Radic Biol Med* 17: 367-372, 1994
- 36) Paolisso G, Giugliano. Oxidative stress and insulin action: Is there a relationship? *Diabetologia* 39: 357-363, 1996
- 37) Skuadotir GV, Shi-Hua D, Brodie AE, Reed DJ, Wander RC. Effects of dietary oils on methyl ketone peroxide on in vivo lipid peroxidation and antioxidants in rat heart and liver. *Lipids* 29: 351-357, 1994
- 38) Draper HH, Agarwal S, Nelson DE, Wee JJ, Ghoshal Ak, Farber E. Effects of peroxidative stress and aged on the concentration of a deoxyguanosine-malondialdehyde adduct in rat DNA. *Lipids* 30: 959-961, 1995
- 39) Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, Armelao F, Franceschelli P, Bartoli GM. n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr* 64: 297-304, 1996

- 40) Wiseman SA, Van den Boom MA, De Fouw NJ, Wassink MG, Op den Kamp JA, Tijburg LB. Comparison of the effects of dietary vitamin E on in vivo and in vitro parameters of lipid peroxidation in the rabbit. *Free Radic Biol Med* 19: 617-626, 1995
- 41) Urano S, Hoshi-Hashizume M, Tochigi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposome to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26: 58-61, 1991
- 42) Leedle RA, Aust SD. Importance of the polyunsaturated fatty acid to vitamin E ratio in the resistance of rat lung microsomes to lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 2: 397-403, 1986
- 43) Skrha J, Sindelka G, Hilgertova J. The effect of fasting and vitamin E on insulin action in obese type 2 diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 827: 556-562, 1997
- 44) Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. Phamachologic doses of vitamin E improves insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 57: 650-658, 1993
- 45) Facchini F, Coulston AM, Reaven GM. Relation between dietary vitamin intake and resistance to insulin-mediated glucose disposal in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 63: 946-952, 1996
- 46) Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A, Halimi S. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr* 127: 103-111, 1997