

# 화학적으로 유도한 랫드 간세포 암화과정에서 단백질 식이가 간의 조직학적 변화와 생체막 안정도에 미치는 영향\*

박경애 · 김현덕\*\*\*\* · 최혜미\*\*

가야대학교 생활과학부 식품영양전공, 전주기전여자대학 식품영양계열\*\*  
서울대학교 식품영양학과\*\*\*

## The Effects of Dietary Proteins on Hepatic Histological Changes and Membrane Stability in Chemically Induced Rat Hepatocarcinogenesis\*

Park, Kyung-Ae · Kim, Hyeonduck\*\*\*\* · Choi, Haymie\*\*

School of Human Ecology, Kaya University, Koryong, Kyungbuk 717-800, Korea  
School of Food & Nutrition,\*\* Chonju Kijeon Women's College, Jeonju, Jeonbuk 560-701, Korea  
Department of Food & Nutrition,\*\*\* Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

### ABSTRACT

The purpose of this study is to determine the effect of dietary proteins and fats on the hepatic histological changes, membrane stability, and drug-metabolizing enzyme activities during chemically induced rat hepatocarcinogenesis. Weanling Sprague-Dawley rats were fed the diet containing 20% casein or soy protein isolate and 15% perilla or corn oil for 10 weeks. Hepatocarcinogenesis was initiated with diethylnitrosamine(DEN), and the rats were fed diets containing 0.02% 2-acetylaminofluorene(AAF) followed by 0.05% phenobarbital (PB). The scores of histological changes were decreased in treated rats fed soy protein diet compared to those fed casein diet. Liver weights were significantly increased by AAF and PB treatment in rats fed casein diets in both oil groups. Glucose 6-phosphatase(G6Pase) activities, an index of membrane stability, were significantly reduced by AAF and PB treatment in rats fed casein diets, and were lower in casein diet compared to soy protein diet groups. Especially, the activities were the highest in the rats fed soy protein-perilla oil diet. Lipid peroxide values also were increased by AAF and PB treatment in rats fed casein diet. Aniline hydroxylase activities were not influenced by protein and fat sources. Glutathione-dependent enzyme activities were increased by AAF and PB treatment. Linoleic and arachidonic acid content were increased in rats fed corn oil diet, and linolenic and eicosapentaenoic acid contents were increased in rats fed perilla oil diet. Our results suggest that soy protein isolate inhibit the abnormal histological changes in liver, possibly by maintaining the membrane stability during chemically induced rat hepatocarcinogenesis. Soy protein may be protective against the hepatocarcinogenesis induced by chemical carcinogen. (*Korean J Nutrition* 34(8) : 833~842, 2001)

KEY WORDS: hepatocarcinogenesis, histologic changes, lipid peroxidation, membrane stability, soy protein.

### 서론

암은 현대의학에서 난치병 중의 하나로, 한국인의 사망원인 중 암에 의한 사망률이 가장 높으며, 간암에 의한 사망률은 위암, 폐암에 이어 세 번째이나,<sup>1)</sup> 세계에서 일본에 이어 두 번째로 가장 높았다.<sup>2)</sup> 사람에서 암 발생의 80~90%가 환경요소에 기인하며,<sup>3)</sup> 사람에서 암 발생의 20~40%가 식

이요인과 관련되어 있으므로,<sup>4)</sup> 식이 조절은 암의 위험률을 낮추는데 크게 기여할 수 있다.

암의 발생은 환경적 요인과 유전적 요인의 복잡한 상호작용으로 일어나는 것으로 추정되고 있으며,<sup>5)</sup> 현대 사회가 산업화, 공업화됨에 따라 발암물질들에 노출될 가능성이 높아지고 있고, 이러한 발암물질을 활성화하거나 해독하는 기능을 가지고 있는 간은 중요시되고 있다. 지금까지 실험동물을 이용한 여러 간 세포 암화과정의 초기단계 연구에 대한 여러 모델들이 개발되어져 왔으며,<sup>6-10)</sup> 식이요인과 암 발생과의 관련성에 관한 실험 연구가 활발히 진행되고 있다.

특히 서구화된 식사로 인한 지방 섭취의 증가 또는 지방의 급원에 따른 암 발생과의 관련성에 관한 연구들이 진행

접수일 : 2001년 9월 3일

채택일 : 2001년 10월 4일

\*This research was supported by the grant from Korea Research Foundation(1997).

<sup>5)</sup>To whom correspondence should be addressed.

되어져 왔다. 식이내 n-3지방산/n-6 지방산의 증가는 DEN과 2/3 간 부분 절제술로 이루어진 간세포 암화과정<sup>11)</sup>과 heterocyclic amine으로 유도한 lymphomas을 억제하였으나,<sup>12)</sup> 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene으로 유도한 랫드 유방암화과정을 촉진하였다.<sup>13)</sup> 들기름이 옥수수기름에 비해 azoxymethane으로 유도한 랫드 대장암화과정을 억제하였고,<sup>14)</sup> n-3 다가불포화지방산이 풍부한 어유가 옥수수기름에 비해 DEN으로 유도된 간세포암화과정을 억제하였으나,<sup>15)</sup> 방광암화과정에서  $\alpha$ -linolenic와 linoleic acid 함유 식이간의 차이는 없었다.<sup>16)</sup>

또한 최근 식이로 섭취하는 단백질의 종류가 암 발생에 미치는 영향에 대한 연구도 진행중에 있다. 대두 isoflavone 추출물의 섭취는 DEN과 PB로 유도한 랫드 간세포 암화과정의 초기단계를 억제하였고,<sup>17)</sup> 대두 전분과 대두 flake 식이는 azoxymethane으로 유도한 F344 랫드 대장암화과정을 억제하였으며,<sup>18)</sup> 식이로 대두의 phytochemicals인 genistein이나 대두단백질식이를 공급하였을 때 전립선암의 전암성 병변이 억제되었으나,<sup>19,21)</sup> 과량의 genistein을 복강 주사했을 때는 종양성장에 아무런 영향이 없었다.<sup>22)</sup> 역학조사에서는 대두 섭취가 폐경 후 여성의 유방암의 위험을 낮추는 것과 상대적으로 덜 관련되지만 폐경 전 여성의 유방암을 낮추는 것과는 관련성이 있었다.<sup>23)</sup>

따라서, 섭취하는 지방의 지방산 형태 및 단백질 급원이 다양한 발암물질로 유도한 여러 조직의 암 발생에 미치는 영향은 서로 다를 것으로 생각된다. 또한 식이 지방과 단백질이 암화과정을 변화시킬 수 있다는 것은 여러 연구에서 밝혀지고 있으며 그 기전에 대한 연구가 진행 중에 있으나, 아직까지 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.

N-3 지방산이 대장의 막 인지질에 n-3 다가불포화지방산을 현저히 증가시킬 수 있고,<sup>14)</sup> 생체막 안정도인 G6Pase 활성을 증가시키며 monooxygenase 활성을 증가시켜 암화과정에 영향을 주었다는 보고<sup>11)</sup>가 있다. 또한, 대두 isoflavones과 genistein의 섭취는 피부와 소장에서 항산화효소와 phase II 효소 활성을 증가시켰고,<sup>17,24,25)</sup> 대두단백질 식이는 간의 GPx와 GR 활성도와 혈액 glutathione 수준을 증가시킬 수 있었다.<sup>26)</sup>

이와 같이 식이지방은 소포체막의 지방산 조성을 변화시킬 수 있고,<sup>27)</sup> 생체막 안정도와 약물대사효소계에 영향을 줄 수 있으며 식이단백질은 항산화효소계와 생체막 안정도에 영향을 주어 암화과정을 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

그러므로, 본 연구에서는 Solt와 Farber의 모델<sup>10)</sup>과 Denda 등의 모델<sup>6)</sup>을 변형한 단기간의 간 세포암 유도모델을 기초로 하여 식이 단백질과 지방의 종류가 랫드 간세포 암

화과정의 개시와 촉진단계에서 간의 조직학적 변화, 생체막 안정도 및 약물대사효소계에 미치는 영향을 규명해 보고자 수행하였다. 단백질의 영향을 살펴보기 위해 동물성 단백질 급원으로 우유단백질(casein)을, 식물성 단백질 급원으로 대두단백질(soy protein isolate)을 사용하였고, 식이지방의 효과를 알아보기 위하여 n-3 지방산의 급원으로 들기름을, n-6 지방산의 급원으로 옥수수기름을 사용하였다.

## 실험방법 및 내용

### 1. 실험동물 사육과 실험식이

서울대학교 실험동물 사육장에서 생후 3주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 공급받아, 5~7마리씩 8군으로 나누어 실험에 사용하였다. 식이단백질의 급원으로는 대두 단백질(soy protein isolate)과 우유단백질(casein)을 사용하였고, 식이지방의 급원으로는 들기름과 옥수수기름을 사용하였다. 단백질과 지방의 급원을 달리하여 4가지의 실험식이(Table 1)를 만들어 질소가스로 충전시켜 밀봉하여 냉동고에 보관하였다가 매일 물과 함께 생후 3주령부터 10주간 공급하였다. 온도, 습도, 조명은 각각  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$ , 12시간(7:00~19:00)으로 조절하였다.

### 2. 실험설계

간 세포암 유도모델은 Solt와 Farber의 다단계 발암 유도 모델<sup>10)</sup>과 Denda 등의 모델<sup>6)</sup>을 변형하여 사용하였다. 4가지 실험식이군을 각각 대조군과 처치군으로 나누어 대조군과 처치군 전체에 대해 사육 후 2주째에 DEN을 생리식염수에 녹여 몸무게(kg)당 200mg 수준으로 복강에 주사하였다. 대조군에게는 계속 실험식이를, AAF-PB처치군에게는 사육후 4주째부터 8주째까지 AAF를 실험식이 무게당 0.02% 수준으로 섭취시켰으며 사육한지 6주부터 PB를 식이무게당 0.05% 수준으로 섭취시킨 후 10주째에 희생시켰다(Fig. 1).

### 3. 시료의 수집 및 전처리

실험동물을 단두하여 희생시킨 후, 간을 적출하여 일부는 조직학적 검사를 위해 면도칼(razor blade)를 사용하여 2~3mm 두께로 잘라 냉아세톤(4°C)에 고정시킨 후 검사에 사용하였다. 그리고 나머지 간은 액체질소로 급속히 냉동시킨 후 보관하였다가 실험에 사용하였다. 약 5g의 간을 잘게 다진 후 25ml의 차가운 균질용 완충용액(154mM Tris-HCl buffer, 1mM EDTA, pH 7.4)에 넣고 균질화한 다음 4°C, 12,000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 중간 층 부분을 모아 다시 4°C, 105,000rpm에서 60분간 초고속원심분리하여 세포질 분획(상층액)과 소포체 분획(pellet)을 얻은

**Table 1.** Composition of experimental diets (g/100 g diet)

Component/diet	SP	CP	SC	CC
Corn starch	54.7	54.7	54.7	54.7
Casein	-	20.0	-	20.0
Soy protein isolate	20.0	-	20.0	-
α-Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Salt mixture <sup>2)</sup>	4.0	4.0	4.0	4.0
D L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Perilla oil	15.0	15.0	-	-
Corn oil	-	-	15.0	15.0
α-Tocopherol	0.015	0.015		

1) Nutritional Biochemicals, ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio. Vitamin mixture is composed of: Vit.A Acetate(500,000IU/g) 1.8g, Vit.D<sub>3</sub>(850,000IU/g) 0.125g, DL-α-Tocopherol(250IU/g) 22.0g, Ascorbic acid 45.0g, Inositol 5.9g, Choline chloride 75.0g, Menadione 2.25g, p-Aminobenzoic acid 5.0g, Niacin 4.25g, Riboflavin 1.0g, Pyridoxine hydrochloride 1.0g, Calcium pantothenate 3.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.09g, Vit.B<sub>12</sub> 0.00135g, and Dextrose to 1kg.

2) Composition of Salt mixture, g/kg mixture: Calcium phosphate dibasic 500g, Sodium chloride 74g, Potassium sulfate 52g, Potassium citrate monohydrate 220g, Magnesium oxide 24g, Manganese carbonate(43 - 48% Mn), 3.5g, Ferric citrate(16 - 17% Fe) 6.0g, Zinc carbonate 1.6g, Cupric carbonate(53 - 55% Cu) 0.3g, Potassium iodate 0.01g, Chromium potassium sulfate 0.55g, Sodium selenite 0.11g, Sucrose, finely powdered 118.0g.

SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet

다음 microtube에 담아 액체질소로 급속 냉동시킨 다음 분석에 사용할 때까지 -70℃에서 보관하였다.

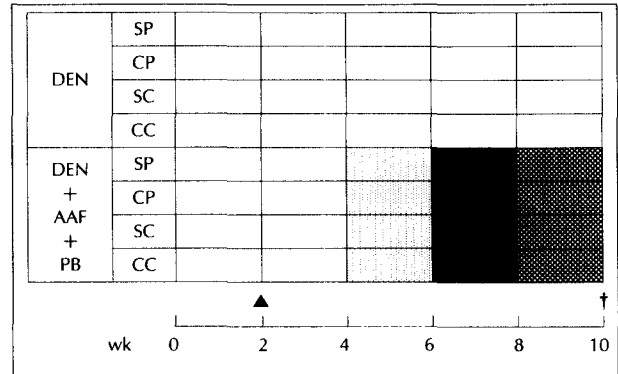
**4. 조직학적 검사**

냉아세톤에 고정시킨 간 시료를 xylene으로 투명화하고 파라핀으로 포매하여 5μm두께로 절편하였다. Xylene으로 파라핀을 녹여내고 농도하강순의 단계적 ethanol 수화과정을 거쳐 조직을 수화시킨 다음 증류수와 0.01M phosphate buffered saline으로 세척하여 Harris' hematoxylin 용액과 eosin 용액으로 염색한 후 탈수과정을 거쳐 건조시킨 다음 광학현미경으로 관찰하였다.<sup>28)</sup> 조직학적 변화는 각각 임의로 수치화하였다.<sup>29)</sup>

**5. 생화학적 검사**

**1) Glucose 6-phosphatase(G6Pase) 활성도 측정**

Baginski 등의 방법<sup>30)</sup>에 따라 간 소포체 분획의 G6Pase로부터 방출되어지는 무기인을 spectrophotometer로 840 nm에서 측정하였다. 효소 활성도는 1분간 생성시킨 반응산물의 mole 농도로 표시하였는데, 1.5mM phosphate 용액을 표준용액으로 사용하였다.



**Fig. 1.** Experimental design. Experimental protocol. ▲: DEN i.p. injection(200mg/kg body weight), †: sacrifice, □: basal diet, □: diet containing 0.02% AAF, ■: diet containing 0.02% AAF plus 0.05% PB, ▨: diet containing 0.05% PB. SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet.

**2) 지질과산화물 함량 측정**

Voca와 Harm-Ringdahl의 방법<sup>31)</sup>에 따라 간 소포체 분획의 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 양을 spectrophotometer로 532nm에서 측정하였다. 이때 표준용액으로는 tetraethoxypropane(TEP)를 사용하였다.

**3) Aniline hydroxylase(AH) 활성도**

Mieyal의 방법<sup>32)</sup>에 따라 간 소포체 분획의 AH 활성도를 측정하였다. p-aminophenol을 standard로 하여 phenol reagent로 발색시켜 흡광도를 구해 계산하였다.

**4) Glutathione S-transferase(GST)활성도**

Habig 등의 방법<sup>33)</sup>에 따라 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)과 환원형 glutathione을 기질로 사용하여 간 세포질 분획의 GST 활성도를 측정하였다. 340nm에서 spectrophotometer로 1분간 흡광도 변화를 측정하였고, 이때 GST 활성도는 CDNB의 분자흡광계수 9.6mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 사용하여 1분동안 결합되는 CDNB의 nmole 수로 표시하였다.

**5) Glutathione peroxidase(GPx) 활성도**

Tappel의 방법<sup>34)</sup>에 따라 cumene hydroperoxide를 기질로 사용하여 간 세포질 분획의 GPx 활성도를 측정하였다. NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 340nm에서 NADPH의 분자흡광계수 6.22mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 이용하여 계산하였다.

**6) Glutathione reductase(GR) 활성도**

Carlberg와 Mannervick의 방법<sup>35)</sup>에 따라 GR 활성도를 측정하였다. 산화형 glutathione과 NADPH를 시료에 첨

**Table 2.** Conditions of gas chromatography for fatty acid determination

Instrument	Hewlett Packard 5890
Column	30m × 0.25mm ID capillary
Packing material	SP <sup>TM</sup> -2330
Detector	FID
Carrier gas	He(50 : 1)
Oven temperature	180℃
Sample injection temperature	210℃
Sample detection temperature	240℃
Initial time	9min
Final time	9min

가하여 NADPH가 감소되는 속도를 340nm에서 측정하였다. GR 활성도는 mg protein당 1분동안 산화되는 NADPH의 nmole수로 표시하였다.

### 7) 단백질 함량 측정

간 소포체 분획과 세포질 분획의 단백질 함량은 Lowry 등의 방법<sup>36)</sup>에 따라 bovine serum albumin 용액을 표준 용액으로 사용하여 측정하였다.

### 6. 간 소포체 분획의 지방산 조성

Bligh와 Dyer의 방법<sup>37)</sup>에 따라 지질을 추출하였다. 지질을 추출한 시료를 methyl ester화 시켜 지방산 함량을 gas liquid chromatography(GLC)로 측정하였는데 조건은 Table 2와 같다. 이때 표준지방산 ester들의 retention time과 비교측정하여 지방산을 분석하였고 함량은 % total area로 계산하였다.

### 7. 통계처리

실험결과는 SPSS 통계 program을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 계산하였고 p < 0.05 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's mutiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의차를 검증하였고, 간 무게, 몸무게, 상대적인 간 무게 및 생화학 검사 결과간의 상관관계를 알아보았다.

## 결과 및 고찰

본 연구는 화학적으로 유도한 간세포 암화과정에서 식이 단백질과 지방의 종류가 간 세포의 조직학적 변화와 G 6Pase 활성도 및 약물대사효소계에 미치는 영향을 규명해 보고자 수행하였다.

### 1. 조직학적 검사와 상대적인 간의 무게

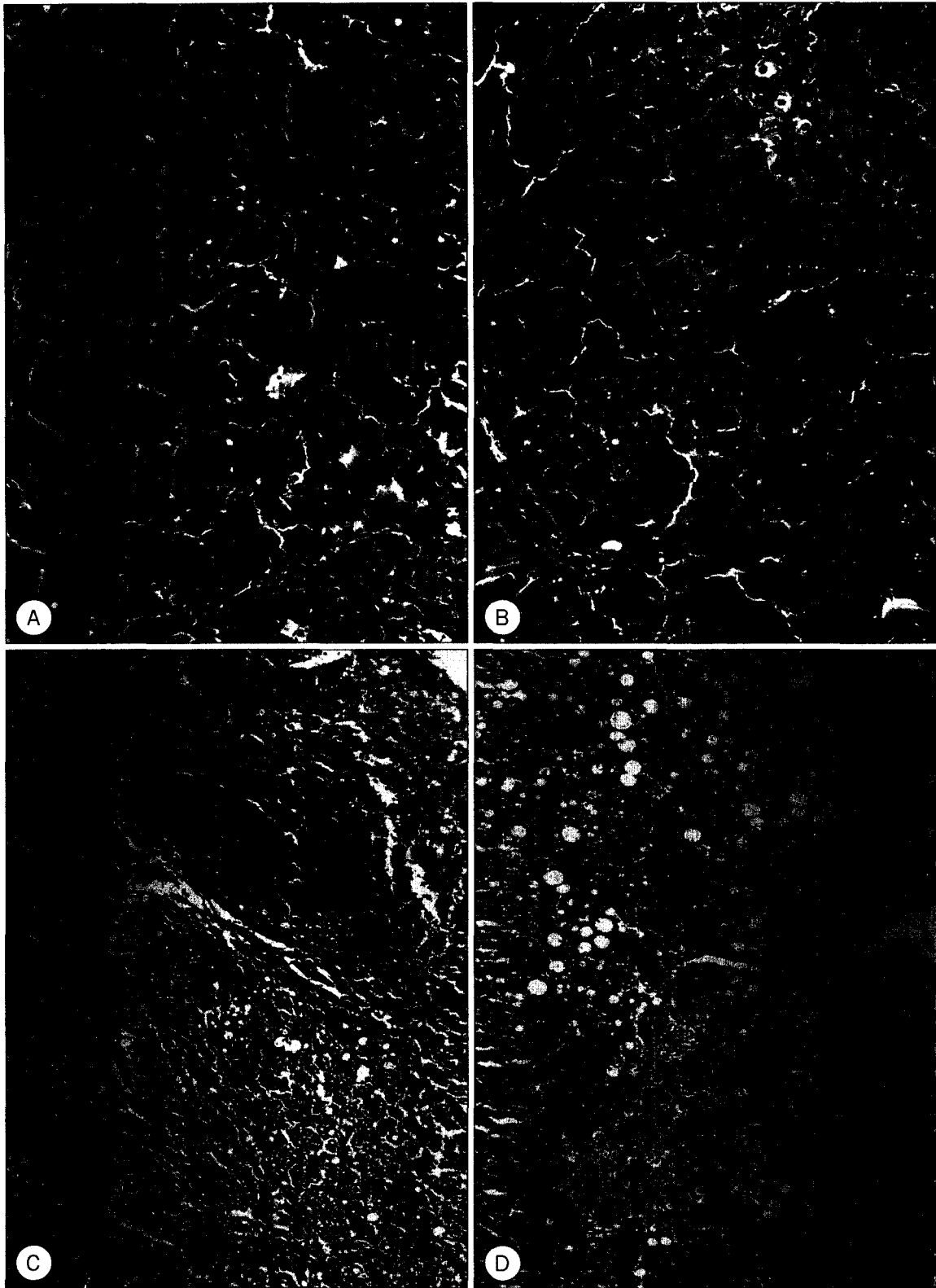
H & E 조직학적 검사 결과, DEN만을 투여한 대조군에

서 지방변성(fatty change)이나 prebalooning 등이 일부 나타난 것도 있었지만 조직학적 변화를 거의 볼 수 없었고, DEN 복강주사와 AAF와 PB 함유 식이를 섭취한 처치군에서 비정상적인 조직학적 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 처치군의 조직학적 검사를 임의의 점수로 나타낸<sup>29)</sup> 조직학적 점수는 대두단백질-옥수수기름군이 우유단백질-들기름군과 우유단백질-옥수수기름군에 비해 유의하게 낮았으며 대두단백질-들기름군은 낮은 경향이었다(Fig. 3). 처치군의 대부분에서 지방변성(fatty change)이나 prebalooning 등이 관찰되었고, 특히 옥수수기름군에서는 담관 증식(bile duct proliferation)과 과증식성 결절(hyperplastic nodule)이 많이 관찰되었다(Fig. 2).

이 결과는 DEN과 ⅓ 간 부분 절제술로 이루어진 랫드 간세포 암화과정에서 식이에 n-3/n-6 지방산의 비율이 높아질수록 암화과정을 억제시켰다는 보고<sup>11)</sup>와는 상반되어 n-3 지방산의 급원인 들기름의 보호 효과를 볼 수 없었으나, 대두 isoflavone 추출물의 섭취가 DEN과 PB로 유도한 암컷 F344/N 랫드 간세포 암화과정을 억제하였다는 보고<sup>17)</sup>와는 일치하여 대두단백질의 보호 작용을 알 수 있었다. 그러므로 화학적으로 유도한 간세포 암화과정의 촉진단계에서 식이 지방에 관계없이 우유단백질이 대두단백질에 비해 비정상적인 조직학적 변화를 많이 가져왔으므로 대두단백질에 의해 비정상적인 간 조직의 변화가 억제될 수 있음을 알 수 있었고, 이러한 억제작용이 암화과정의 초기단계보다는 촉진단계에 더 영향을 주었다고 생각된다.

각 식이군에서 처치군의 몸무게는 대조군에 비해 낮은 경향이었고 처치군과 대조군 모두에서 우유단백질-옥수수기름군이 대두단백질-들기름군에 비해 유의하게 낮았으며, 처치군의 간 무게는 대조군에 비해 유의하게 높았고 대조군과 처치군 모두에서 대두단백질군의 간 무게가 우유단백질군에 비해 유의하게 낮았다(Table 3).

간의 비대를 나타내는 기준으로 사용되는 체중에 대한 간의 무게(상대적인 간의 무게)의 경우 처치군이 대조군에 비해 유의하게 증가했고, 처치군에서 우유단백질군이 대두단백질군에 비해 상대적인 간의 무게가 유의하게 증가했다(Table 3). 간 무게의 증가는 간 세포암 초기에 병소에서 탄수화물 대사의 변화로 인한 과량의 glycogen 축적, 지방의 일시적인 축적 및 PB에 의해 소포체막을 많이 함유한 간세포의 크기가 증식되었기<sup>9)</sup> 때문으로 생각되어진다. 대두단백질에 비해 우유단백질에 의한 상대적인 간 증대 작용이 화학적 암화과정의 개시단계가 아닌 촉진단계 또한 영향을 줄 것으로 사료된다.



**Fig. 2.** Histologic demonstration of hematoxylin & eosin staining of liver from rats fed diets containing AAF and PB(X 115). A: SP, soy protein isolate plus perilla oil diet. B: CP, casein plus perilla oil diet. C: SC, soy protein isolate plus corn oil diet. D: CC, casein plus corn oil diet.

2. 생화학적 검사

G6Pase 활성도는 대조군과 처치군에서 우유단백질-옥수수기름군이 다른 군에 비해 유의하게 낮았으며, 처치군에서 들기름군과 옥수수기름군에서 각각 대두단백질이군이 우유단백질군에 비해 유의하게 높았다(Fig. 4).

G6Pase는 간과 신장의 막 부착효소로서 세포 손상시 그 활성도가 감소한다고 알려져 있어,<sup>30)</sup> 세포막의 안정도를 나타내는 지표로 사용된다. 우유단백질군에서 AAF와 PB 처리에 의해 G6Pase 활성도가 유의하게 감소했는데, 이는 발암물질 처리에 의해 동물성 단백질인 우유단백질이 대두단백질에 비해 간세포가 더 손상되었고, 그로 인해 간의 변형소에서 G6Pase 활성도가 감소하여 간 소포체 분획의 G6Pase 활성도가 감소된 것으로 생각된다. 그리고, 우유단백질에 비해 대두단백질군의 G6Pase 활성도가 상대적으로 높은 것은 대두단백질의 소포체막을 안정화시키는 어떤 기

전에 의해 암화과정의 촉진과정을 약간 늦추거나 방해하여 간세포에 손상을 덜 주는 것으로 이해된다. G6Pase 활성도와 상대적 간의 무게간에 유의한 음의 상관관계를 보였다( $r = -0.625, p < 0.001$ ).

지질과산화물 함량은 우유단백질군에서는 AAF와 PB 처리에 의해 유의하게 높아졌으나, 대두단백질군에서는 높아지는 경향이었지만 유의하지 않았다(Fig. 5).

우유단백질군에서 AAF-PB 처리에 의해 지질과산화물인 TBARS 양이 유의적으로 증가했던 결과는 DEN과 AAF로 유도한 간 세포 암화과정에서 발암물질 투여와 암화과정 초기동안 지질과산화물 함량이 증가했다는 보고들<sup>38-40)</sup>과 일치했다. 반면, 대두단백질군에서는 AAF와 PB 처리에 의해 지질과산화물 함량이 유의하게 증가되지 않았으므로 대두의 항산화 효과에 대한 보고들<sup>24,25,41)</sup>과 어느 정도 일치한다. 특히 지질과산화물함량과 간무게 간에는 유의한 양의 상관

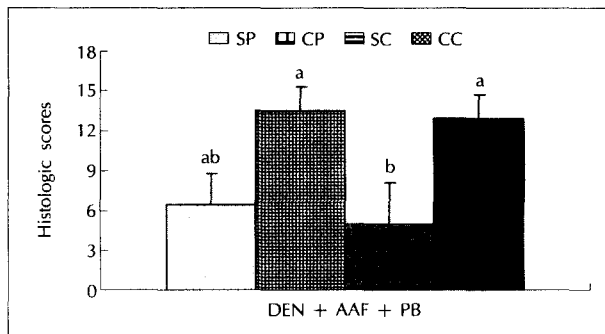


Fig. 3. Effects of different dietary protein and fat sources on scores for histological changes in rats fed diet containing AAF and PB. AAF: 2-acetylaminofluorene, PB: phenobarbital, SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet. Number of animals is 5. Values are mean  $\pm$  SE. Each bar with different letters is significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

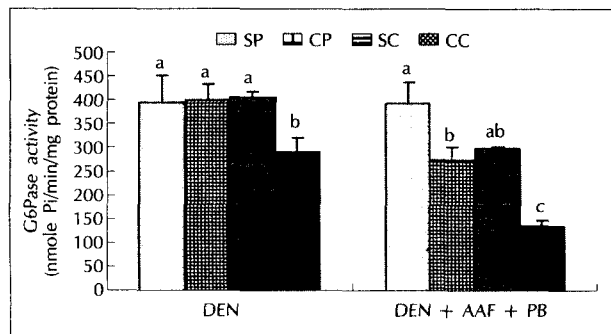


Fig. 4. Effects of different dietary protein and fat sources on hepatic microsomal G6Pase activities in rats fed basal diet or diet containing AAF and PB. AAF: 2-acetylaminofluorene, PB: phenobarbital, SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet. Number of animals is 5. Values are mean  $\pm$  SE. Each bar with different letters is significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

Table 3. Effects of different dietary protein and fat sources on body weight, liver weight, relative liver weight in rats fed basal diet or diet containing AAF and PB

Group	Body weight(g)	Liver weight(g)	Relative liver weight	
DEN	SP(7) <sup>1)</sup>	325.71 $\pm$ 9.48 <sup>cd</sup>	6.98 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	2.15 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
	CP(6)	366.67 $\pm$ 16.06 <sup>ab</sup>	8.34 $\pm$ 0.51 <sup>d</sup>	2.28 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>
	SC(6)	340.00 $\pm$ 8.56 <sup>abc</sup>	7.87 $\pm$ 0.27 <sup>dc</sup>	2.31 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
	CC(7)	370.00 $\pm$ 16.62 <sup>a</sup>	8.76 $\pm$ 0.59 <sup>cd</sup>	2.36 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
DEN + AAF + PB	SP(6)	301.67 $\pm$ 9.46 <sup>d</sup>	9.65 $\pm$ 0.33 <sup>bc</sup>	3.21 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
	CP(6)	330.00 $\pm$ 8.56 <sup>bcd</sup>	11.80 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	3.57 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
	SC(7)	315.71 $\pm$ 12.70 <sup>d</sup>	10.41 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	3.29 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
	CC(7)	345.71 $\pm$ 9.22 <sup>abc</sup>	12.60 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	3.65 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>

AAF: 2-acetylaminofluorene, PB: phenobarbital, SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet

1) Number of animals. Values are mean  $\pm$  SE. abc: Values with different superscripts are significantly different among groups by ANOVA test ( $p < 0.05$ ).

관계를 보여( $r = 0.529, p < 0.01$ ) 지질과산화물 증가가 간 비대와 밀접한 관련이 있음을 보여준다.

처치군의 AH 활성도는 대조군에 비해 높은 경향이었으나 유의하지 않았으며, 각 군에서 우유단백질-들기름군만 다른 군에 비해 높은 경향이었으나 유의하지 않았다(Table 4).

AH는 AAF와 PB에 의해 유도되는 P450 의존성 mixed function oxidase 효소의 하나로 다양한 산화, 환원 반응을 통해 내인성 물질을 대사하거나 외인성물질을 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있는데,<sup>42)</sup> 간세포 암화과정에서 식이 단백질과 지방의 차이에 의한 활성도의 변화는 볼 수 없었다.

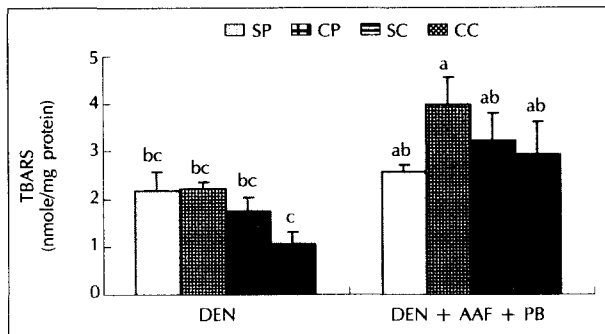
처치군의 GST와 GR 활성도는 대조군에 비해 유의하게 높았고, GPx 활성도는 유의하게 감소하였다(Table 4). 이 결과는 DEN과 AAF로 유도된 간세포 암화 촉진과정 동안

foci 또는 hyperplastic nodule이 나타남과 함께 간의 GST 활성도와 GR의 활성도가 증가했고, GPx 활성도가 감소했다는 보고들<sup>43,44)</sup>과 일치한다. 또한 DEN과 PB로 유도한 암컷 F344/N 랫드 간세포 암화과정에서 대두 isoflavone 추출물의 섭취가 GPx 활성도를 증가시켰다는 보고<sup>17)</sup>도 있어 대두단백질에 의한 약물대사효소에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되나, 본 연구에서는 간세포 암화과정에서 glutathione-의존성 효소의 활성 변화의 경향은 볼 수 있었으나 식이에 의한 영향은 볼 수 없었다.

### 3. 지방산 조성

식이지방산 조성은 소포체막에 잘 반영되었다. 대조군에서는 옥수수기름군이 들기름군에 비해 linoleic acid(18 : 2)와 arachidonic acid(20 : 4)가 유의하게 높았으나 처치군에서는 arachidonic acid함량만 유의하게 높았다(Table 5). Eicosapentaenoic acid 함량은 처치군과 대조군 모두에서 들기름군이 유의하게 높았거나 높은 경향이였다(Table 5).

간 소포체 분획의 지방산 조성을 살펴본 결과 두 가지 지방 식이의 지방산조성의 특징이 반영되어 식이지방산의 조성이 생체막으로 빠르게 유입된다는 여러 보고들<sup>44,45,46)</sup>과 일치하는 경향을 보였다. 또한 고도불포화지방산의 섭취는 랫드 간에서 막에 부착된 효소의 활성도를 증가시키는 것으로 보고되어져 왔으나<sup>47,48)</sup>식이 지방에 의한 막 부착 효소 활성도의 차이는 볼 수 없었다. Arachidonic acid는 암세포 확산에 필수적인 prostaglandin의 기질이 될 수 있으므로,<sup>49)</sup> 옥수수기름에 비해 들기름이 그 전구체가 되는 linoleic acid 함량이 적기 때문에 암 세포 암화과정에 대해 보호작용도 기대할 수 있으나, 본 연구에서는 식이지방에 의한 간세포의 조직학적 변화와 생체막 안정성 및 약물대사효소계



**Fig. 5.** Effects of different dietary protein and fat sources on hepatic microsomal TBARS contents in rats fed basal diet or diet containing AAF and PB. AAF: 2-acetylaminofluorene, PB: phenobarbital, SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet. Number of animals is 5. Values are mean  $\pm$  SE. Each bar with different letters is significantly different by Duncan's multiple range test( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Effects of different dietary protein and fat sources on microsomal AH, cytosolic GST, GR and GPx activities in rats fed basal diet or diet containing AAF and PB

Group	AH activity (nmole/min/mg protein)	GST activity(nmole NADPH/min/mg protein)	GR activity(nmole NADPH/min/mg protein)	GPx activity(nmole NADPH/min/mg protein)	
DEN	SP(5) <sup>1)</sup>	1.675 $\pm$ 0.273 <sup>b</sup>	325.05 $\pm$ 25.15 <sup>b</sup>	31.21 $\pm$ 5.27 <sup>b</sup>	24.65 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>
	CP(5)	8.182 $\pm$ 6.409 <sup>ab</sup>	312.63 $\pm$ 30.12 <sup>b</sup>	28.39 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	29.20 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>
	SC(5)	2.438 $\pm$ 0.242 <sup>b</sup>	348.33 $\pm$ 23.96 <sup>b</sup>	27.78 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>	27.64 $\pm$ 2.35 <sup>ab</sup>
	CC(5)	1.183 $\pm$ 0.115 <sup>b</sup>	365.68 $\pm$ 24.07 <sup>b</sup>	30.52 $\pm$ 2.44 <sup>b</sup>	28.15 $\pm$ 0.71 <sup>ab</sup>
DEN + AAF + PB	SP(5)	10.106 $\pm$ 0.427 <sup>ab</sup>	621.93 $\pm$ 23.45 <sup>a</sup>	53.38 $\pm$ 5.92 <sup>a</sup>	12.99 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>
	CP(5)	12.685 $\pm$ 1.102 <sup>a</sup>	670.08 $\pm$ 23.80 <sup>a</sup>	58.04 $\pm$ 3.36 <sup>a</sup>	14.59 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>
	SC(5)	5.592 $\pm$ 1.281 <sup>ab</sup>	612.38 $\pm$ 108.76 <sup>a</sup>	52.36 $\pm$ 9.12 <sup>a</sup>	14.80 $\pm$ 1.12 <sup>c</sup>
	CC(5)	6.613 $\pm$ 0.325 <sup>ab</sup>	491.06 $\pm$ 31.17 <sup>a</sup>	54.09 $\pm$ 2.71 <sup>a</sup>	11.98 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>

AH: aniline hydroxylase, GST: glutathione S-transferase, GR: glutathione reductase, GPx: glutathione peroxidase, AAF: 2-acetylaminofluorene, PB: phenobarbital, SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet

1) Number of animals. Values are mean  $\pm$  SE. abc: Values with different superscripts are significantly different among groups by ANOVA test( $p < 0.05$ ).

**Table 5.** Effects of different dietary protein and fat sources on hepatic microsomal fatty acid composition in rats fed basal diet or diet containing AAF and PB Fatty acid composition

Fatty acid	DEN				DEN + AAF + PB			
	SP(3)	CP(3)	SC(3)	CC(4)	SP(3)	CP(3)	SC(3)	CC(4)
14 : 0	0 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>ab</sup>
16 : 0	18.7 ± 1.6 <sup>ab</sup>	21.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	20.2 ± 0.9 <sup>ab</sup>	20.6 ± 0.1 <sup>ab</sup>	17.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	16.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	17.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	19.4 ± 1.5 <sup>ab</sup>
16 : 1	1.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.6 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>ab</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>
18 : 0	23.9 ± 2.7	23.5 ± 3.9	19.7 ± 1.6	17.9 ± 1.3	20.0 ± 0.6	20.4 ± 0.6	20.3 ± 1.0	19.6 ± 0.8
18 : 1	13.1 ± 2.5	10.7 ± 0.2	10.2 ± 0.5	11.4 ± 0.3	12.0 ± 0.5	10.9 ± 0.2	11.4 ± 0.9	11.5 ± 0.7
18 : 2	18.1 ± 3.5 <sup>b</sup>	16.4 ± 2.7 <sup>b</sup>	25.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	25.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	26.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	25.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	24.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	26.7 ± 1.1 <sup>a</sup>
18 : 3	7.2 ± 2.6 <sup>ab</sup>	8.9 ± 1.7 <sup>ab</sup>	3.3 ± 2.2 <sup>cd</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>d</sup>	8.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	12.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.8 <sup>d</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>e</sup>
20 : 2	1.5 ± 1.5	3.5 ± 3.0	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.3	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.2
20 : 4	11.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	6.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	18.9 ± 2.2 <sup>a</sup>	19.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	21.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	20.1 ± 2.0 <sup>a</sup>
20 : 5	3.9 ± 1.4 <sup>ab</sup>	5.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.9 <sup>ab</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.8 ± 1.6 <sup>ab</sup>	4.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>
22 : 6	1.0 ± 1.0	1.7 ± 1.7	0.7 ± 0.7	1.1 ± 1.1	0	0.7 ± 0.7	0	0
18 : 2 + 20 : 4	29.5 ± 3.0 <sup>b</sup>	23.0 ± 4.4 <sup>a</sup>	43.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	44.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	36.4 ± 2.7 <sup>b</sup>	31.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	46.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	46.7 ± 2.2 <sup>a</sup>
18 : 3 + 20 : 5	11.1 ± 3.7 <sup>ab</sup>	13.9 ± 3.4 <sup>a</sup>	5.8 ± 2.8 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.6 <sup>c</sup>	10.8 ± 2.8 <sup>ab</sup>	17.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.8 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>c</sup>

DEN: diethylnitrosamine, AAF: 2-acetylaminofluorene, PB: phenobarbital, SP: soy protein isolate plus perilla oil diet, CP: casein plus perilla oil diet, SC: soy protein isolate plus corn oil diet, CC: casein plus corn oil diet

1) Number of animals. Values are mean ± SE. abc: Values with different superscripts in a row are significantly among between groups by ANOVA test(p < 0.05).

의 변화는 볼 수 없었다.

## 결론 및 요약

본 연구는 DEN, AAF 및 PB로 유도한 랫드 간세포 암화과정에서 식이 단백질과 지방의 급원이 간 세포의 조직학적 변화에 미치는 영향을 살펴보고 그 기전을 규명해보고자 수행하였다.

1) DEN, AAF, PB 등의 발암원 처치군에서 비정상적인 조직학적 변화를 관찰할 수 있었다. 처치군에서 조직학적 검사를 임의의 점수로 나타낸 조직학적 점수는 대두단백질-옥수수기름군이 우유단백질-들기름군과 우유단백질-옥수수기름군에 비해 유의하게 낮았으며 대두단백질-들기름군은 낮은 경향이었다. 대두단백질에 의해 간의 비정상적인 조직학적 변화가 억제되어질 수 있음을 알 수 있었고, 이러한 억제작용이 암화과정에 영향을 줄 것으로 생각된다.

2) 식이에 AAF와 PB를 첨가했을 때, 상대적인 간의 무게가 증가했고, 우유단백질군의 간의 무게가 대두단백질군에 비해 상대적인 간의 무게가 유의하게 증가했으므로, 우유단백질에 의해 간이 비대해졌음을 알 수 있다.

3) 대조군과 처치군에서 G6Pase 활성도는 우유단백질-옥수수기름군이 다른 군에 비해 유의하게 낮았으며, 처치군에서 들기름군과 옥수수기름군에서 각각 대두단백질군이 우유단백질군에 비해 유의하게 높았으므로 대두단백질이 생체막 안정성을 유지하는데 기여했음을 알 수 있다.

4) 우유단백질군에서만 AAF와 PB 처리에 의해 지질과산화물 함량이 유의하게 높아져 암화과정에서 지질과산화반응이 촉진되어지고 그로 인하여 조직의 손상이 증가되어 간이 비대해진 것으로 보여진다.

5) AAF-PB처리군의 AH 활성도는 대조군에 비해 높은 경향이었으나 유의하지 않았다. AAF-PB처리군의 GST와 GR 활성도는 대조군에 비해 유의하게 높았고, GPx 활성도는 감소하였으나, 식이에 의한 차이는 보이지 않았다.

6) 식이지방산 조성은 소포체막에 잘 반영되었다. 대조군에서는 옥수수기름군이 들기름군에 비해 linoleic acid(18 : 2)와 arachidonic acid(20 : 4)가 유의하게 높았으나 AAF-PB처리군에서는 arachidonic acid함량만 유의하게 높았다. Linolenic acid과 eicosapentaenoic acid 함량은 처치군과 대조군 모두에서 들기름군이 유의하게 높았거나 높은 경향이었다.

본 실험 결과를 보면 식이지방의 종류(n-3 또는 n-6) 보다는 식물성 급원인 대두단백질 식이가 동물성 급원인 우유단백질 식이에 비해 화학적 발암원으로 유도한 간세포 암화과정에서 생체막 안정도를 높게 유지하여 간의 비대를 억제하고 비정상적인 조직학적 변화를 감소시켜 암화과정의 촉진과정을 억제하는데 기여했을 것으로 사료된다. 따라서 대두단백질의 섭취는 화학적 발암원으로 유도한 랫드 간세포 암화과정의 촉진과정을 억제시킬 가능성이 있으며, 대두단백질은 간 세포 암화과정을 억제할 수 있는 예방적인 식이요법에 대한 기초자료로 활용될 수 있으며, 항암효과를 지



닌 대두단백질의 성분 및 항암 기전에 관한 연구가 앞으로 계속 수행되어야 할 것이다.

■ 감사의 글

본 연구 중 간의 조직학적 검사에 많은 도움을 주신 카톨릭의대 이수영 교수님께 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Korea National Statistical Office: The cause of death statistics(1981 - 1999) in 2000
- 2) WHO in 1999
- 3) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1193-1308, 1981
- 4) Ames NN, Gold LS, Willette WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5258-5265, 1995
- 5) Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 605: 191-215, 1980
- 6) Denda A, Ura H, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Eimoto H, Takashima Y, Kitazawa S, Kinugasa T, Konishi Y. Possible involvement of arachidonic acid metabolism in phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 10: 1929-1935, 1989
- 7) Emmelot P, Scherer E. The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis -A quantitative approach. *Biochim Biophys Acta* 605: 247-304, 1980
- 8) Farber E. The biochemistry of preneoplastic liver: a common metabolic pattern in hepatocyte nodules. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 486-494, 1984
- 9) Ito N, Imaida K, Hasegawa R, Tsuda, H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 19: 421-432, 1989
- 10) Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263: 701-703, 1976
- 11) Kim Y, Ji SK, Choi H. Modulation of liver microsomal monooxygenase system by dietary n-6/n-3 ratio in rat hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer* 37(1): 65-72, 1998
- 12) Josyula S, Schut HA. Dietary omega-3 fatty acids as potential inhibitors of carcinogenesis: effect on DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP) in mice and rats. *Food Chem Toxicol* 37(4): 287-296, 1999
- 13) Sasaki T, Kobayahi Y, Shimizu J, Wada M, In'nami S, Kanke Y, Takita T. Effects of dietary n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on mammary carcinogenesis in rats. *Nutr Cancer* 30(2): 137-143, 1998
- 14) Onogi N, Okuno M, Komaki C, Moriwaki H, Kawamori T, Tanaka T, Mori H, Muto Y. Suppressing effect of perilla oil on azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts in rats. *Carcinogenesis* 17(6): 1291-1296, 1996
- 15) Rahman KM, Sugie S, Okamoto K, Watanabe T, Tanaka T, Mori H. Modulating effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids in initiation and postinitiation stages of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 90(1): 31-39, 1999
- 16) Kitano M, Mori S, Chen T, Murai T, Fukushima S. Lack of promoting effects of alpha-linolenic, linoleic or palmitic acid on urinary bladder carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 86(6): 530-534, 1995
- 17) Lee KW, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. Soybean isoflavone extract suppresses early but not later promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital in female rat liver. *Nutr Cancer* 24(3): 267-278, 1995
- 18) Thiagarajan DG, Bennink MR, Bourquin LD, Kavas FA. Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flake, soy flour, genistein and calcium. *Am J Clin Nutr* 68(6Suppl): 1394S-1399S, 1998
- 19) Makela SI, Pylkkanen LH, Santti RSS, Adlercreutz H. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. *J Nutr* 125: 437-445, 1995
- 20) Pollard M, Luckert PH. Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats. *Nutr Cancer* 28: 41-45, 1997
- 21) Zhang JX, Hallmans G, Landstrom M. Soy and rye diets inhibit the development of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma in rats. *Cancer Lett* 114: 313-314, 1997
- 22) Naik HR, Lehr JE, Pienta KJ. An in vitro and in vivo study of antitumor effects of genistein on hormone refractory prostate cancer. *Anticancer Res* 14: 2617-2620, 1994
- 23) Messina MJ. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 70(suppl): 439S-459S, 1999
- 24) Cai Q, Wei H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer* 25: 1-7, 1996
- 25) Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 208(1): 124-130, 1995
- 26) Appelt LC, Reicks MM. Soy induces phase II enzymes but dose not dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J Nutr* 129: 1820-1826, 1999
- 27) Hammer CT, Wills ED. The effect of dietary fats on the composition of the liver endoplasmic reticulum and oxidative drug metabolism. *Br J Nutr* 41: 465-475, 1979
- 28) Bauer JD, Ackermann PG, Toro C. Method of tissue examination. In: *Clinical Laboratory Methods*, pp.813-817, Mosby, 1974
- 29) Han IH. Study on the origin of cholangiocarcinoma by histochemical examination. *A collection of learned papers of Medical School, Catholic University of Korea* 32: 361-372, 1979
- 30) Baginski ES, Foa, PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. In: *Method of Enzymatic Analysis* vol 2, pp.876-880, Academic Press. New York, 1983
- 31) Voca CE, Harm-Ringdahl M. Lipid peroxidation on the rat liver S9 fraction: Influence of membrane lipid composition. *Mutat Res* 162: 21-32, 1986
- 32) Mieyal JJ. Acceleration of the autooxidation of human oxyhemoglobin by aniline and its relation to hemoglobin-catalyzed aniline hydroxylation. *J Biol Chem* 251: 3442-3446, 1976
- 33) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
- 34) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides, In: *Method of Enzymatic Analysis* vol 52, pp.506-513. Academic Press. New York, 1978
- 35) Carberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. In: *Method in enzymology* vol. 113, pp.484-490, Academic Press. New York, 1985
- 36) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 93: 265-275, 1951
- 37) Bligh EG, Dyer NJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 37: 911-917, 1957
- 38) Chamberger RJ. Increase of peroxidation in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 48: 1491-1497, 1972
- 39) Kim HS, Kim H-S, Choi H. The effects of green tea infusion on the preneoplastic lesions and peroxidation in rat hepatocarcinogenesis. *Korean J Community Nutrition* 2(5): 735-744, 1997
- 40) Lankin VZ, Polyakov VM, Aakhangel SAV, Gurevich SM. Metabolism of lipid peroxide during chemical carcinogenesis. *Bull Exp Biol Med* 87: 270-273, 1979
- 41) Madani S, Prost J, Belleville J. Dietary protein level and origin(casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma

- lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. *Nutrition* 16(5): 368-75, 2000
- 42) Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. P450 and human cancer. *Jpn J Cancer Res* 82: 1325-1335, 1991
- 43) Kitahara A, Yamazaki T, Ishikawa T, Camba EA, Kiyomi S. Changes in activities of glutathione peroxidases and glutathione reductases during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Jpn J Cancer Res* 74: 649-655, 1983
- 44) Stout DL, Becker FF. Xenobiotic metabolizing enzymes in genetically and chemically initiated mouse liver tumors. *Cancer Res* 46: 2693-2696, 1986
- 45) Christon R, Fernandez Y, Cambon-Gros C, Periquet A, Deltour P, Leger CL, Mitjavila S. The effect of dietary essential fatty acid deficiency on the composition and properties of the liver microsomal membrane of rats. *J Nutr* 118: 1311-1318, 1988
- 46) Yamaoka S, Urade R, Kito M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr* 118: 290-296, 1988
- 47) Hopkins GJ, West CE. Effect of dietary fats on phenobarbitone-induced sleeping time and hepatic microsomal cytochrome P-450 in rats. *Lipids* 11: 736-740, 1976
- 48) Norred WP, Wade AE. Dietary fatty acid-induced alteration of hepatic microsomal drug metabolism. *Biochem Pharmacol* 21: 2887-2897, 1972
- 49) Frische KE, Johnston RV. Effect of dietary  $\alpha$ -linolenic acid on growth, metastasis, fatty acid profile and prostaglandin production of two murine mammary adenocarcinomas. *J Nutr* 120: 1601-1609, 1990