

생쥐에서 N-Nitrosodiethylamine에 의한 산화성 스트레스에 대한 Lutein의 항산화효과

최병철 · 심상수[#]

중앙대학교 약학대학

(Received April 1, 2009; Revised April 10, 2009; Accepted April 20, 2009)

Antioxidant Effect of Lutein on N-Nitrosodiethylamine-induced Oxidative Stress in Mice

Byung-Chul Choi and Sang Soo Sim[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University

Abstract — To investigate the antioxidant effect of lutein on N-nitrosodimethylamine (NDEA)-induced oxidative stress in mice, we measured lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD) and catalase of various tissues. Body weight was almost similar in lutein and control groups during 3 weeks. NDEA increased significantly the activities of typical marker enzymes of liver function (AST, ALT and ALP) in both groups. However, the increase of plasma aminotransferase activity significantly decreased in lutein group. Lipid peroxidation and SOD in various tissues, such as heart, lung, liver, kidney, spleen and plasma were significantly increased by NDEA, which were significantly reduced by lutein at a dose of 50 mg/kg. Catalase activity decreased significantly in control and lutein groups treated with NDEA, the effect being less in lutein group. Lesser effect on SOD and catalase in NDEA-treated lutein group indicates the improvement of protective mechanisms by lutein. Thus, it can be concluded from the present study that lutein can offer a useful protection against NDEA-induced oxidative stress.

Keywords □ reactive oxygen species, superoxide dismutase, catalase, lipid peroxidation, lutein

Lutein은 카로티노이드 계열의 항산화제로서 눈의 황반과 수정체와 같이 특정 조직에 많이 분포하고 있다.¹⁾ 이들은 다양한 채소나 과일에 존재하지만 그 중 특히 케일과 시금치에 다량으로 함유되어 있다.²⁾ Lutein은 태양광중 파란 빛을 차단함으로써 망막세포의 변성을 막아주는 항산화의 역할을 한다.³⁾ 또한 동맥경화증에서도 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Lutein을 경구 투여한 흰쥐에서 저밀도지단백의 산화가 억제되었으며, 혈장내 지질과산화물의 농도가 감소하였다.⁴⁾ 한편 Raw 264.7 세포에서 유해산소의 생성을 억제할 뿐만 아니라, 다양한 염증매개물질의 생성을 억제한다는 보고가 있다.^{5,6)}

N-nitrosodimethylamine(NDEA), N-nitrosodiethylamine, N-nitrosopyrrolidine과 Nnitrosopiperidine과 같은 N-nitroso 화합물은 발암물질로서 유제품, 육류제품, 청량음료나 알코올성 음료 같은 다양한 식품에 함유되어 있다.^{7,8)} Nitroso 화합물은 인체

내에서 amine 또는 amide 화합물이 nitrite와 반응하여 형성될 수 있다.⁹⁾ Nitroso 화합물 및 전구체가 인체 내에서 다량적인 생성은 잠재적으로 인체내에서 암의 유발과 연관된다는 주장이 제기되고 있다.^{10,11)} 암을 유발시키지 않더라도 NDEA와 같은 nitroso 화합물은 free radical을 형성하면서 산화적인 스트레스와 세포상해를 입힐 가능성도 제기되고 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 이로 인한 유해산소 유리기는 노화에 의한 퇴행적인 만성 질병의 중요한 원인이 된다.¹⁵⁾ 따라서 인체내에서 자연적으로 생성될 수 있는 NDEA에 의한 산화성 스트레스를 방어할 수 있는 lutein의 역할을 구명하는 것은 매우 중요한 일이라 생각된다. 이 논문에서는 NDEA를 처치한 생쥐의 다양한 조직에서 lutein이 지질과산화와 SOD 및 catalase 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험 방법

재료

Lutein은 (주)한국알리코팜(대한민국, 경기도 부천시)에서 기증 받아 사용하였다. N-Nitrosodiethylamine(NDEA), hexadecyltri-

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) simss@cau.ac.kr

methylammonium bromide(HTAB), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), tetramethylbenzidine(TMB), dichlorofluorescein(DMF), thiobarbituric acid(TBA), hypoxanthine, nitroblue tetrazolium(NBT)과 xanthine oxidase는 Sigma사(St. Louis, Mo, USA)에서 구매하였으며 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probes 사(Leiden, Netherlands)에서 구매했다.

동물

수컷 BALB/c 생쥐(24~31 g, 6주령)를 한림동물원에서 구매하였으며, 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 및 광도 300~500 Lux로 조절되는 표준적인 동물실에서 사육하였다. 동물실험 계획서는 중앙대학교 동물 실험에서 사용하는 윤리사항을 준수하였다. 이 동물들을 무작위로 두 그룹으로 나누었다. Lutein(50 mg/kg)을 올리브 오일에 녹여 경구 투여한 lutein 군($n=16$)과 동량의 올리브 오일만을 투여한 대조군($n=16$)으로 구분하였다. 3주 동안 경구 투여한 후, 각 그룹 동물중 반을 NDEA(200 mg/kg 체중)를 생리식염수 0.5 ml와 혼합한 후 복강투여하여 산화적 스트레스를 유발하였다. 그리고 나머지 반은 생리식염수를 동량 투여하였다.

시료채취

스트레스를 유발하고 48시간 후에 에테르로 마취시켰다. 심장 천자로 혈액을 채취한 후 간, 신장, 비장, 심장 그리고 폐를 절취하여 생리식염수로 세척하고 분석을 위해서 -20°C 에 보관하였다.

생화학적 분석

혈장 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)의 활성은 Reitman and Frenkel(1957)방법에 따라 측정하였으며,¹¹⁾ alkaline phosphatase(ALP)활성은 p-nitrophenylphosphate을 기질로 측정하였다.¹⁶⁾ ALP의 활성은 p-nitrophenylphosphate이 가수분해되어 생성되는 p-nitrophenol를 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지질과산화물 측정

지질과산화물을 측정하기 위하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 형광을 이용하였다. 조직의 균질액에 50% trichloroacetic acid를 가하여 최종 5% 농도로 조절하였다. 동량의 0.325% 2-thiobarbituric acid(in 50% acetic acid)를 첨가하여 95°C 에서 30 min 배양하였다. 원심분리 후 200 μl 를 96 well plate에 옮기고 Ex: 485 nm, Em: 535 nm에서 형광을 측정하였다. 표준물질로서는 malonyldialdehyde(1,1,3,3-tetraethoxypropane, Sigma)를 사용하였다.¹⁷⁾ 단백질의 농도는 표본과 비교하여 bicinchoninic acid(BCA)방법으로 측정하였으며, 결과는 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein으로 기록하였다.¹⁸⁾

Superoxide dismutase(SOD) 측정

Nitroblue tetrazolium(NBT) reduction을 넣은 hypoxanthine/xanthine oxidase 발생하는 system을 이용하여 SOD 활성을 측정하였다(Kirby *et al.*, 1997). 조직 균질액을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 1 mM K-EDTA, 0.6 mM hypoxanthine, 0.2 mM NBT, 20 mU/ml xanthine oxidase가 포함된 용액과 혼합하여 37°C 에서 20분간 배양하고 590 nm에서 측정한다.¹⁹⁾

Catalase 측정

Catalase 활성은 240 nm에서 H_2O_2 분해에 의해 UV 흡광도가 감소되는 것을 이용하여 측정하였으며 결과는 units per milligram으로 나타내었다.

세포내 Reactive oxygen species(ROS) 정량

마우스에서 기원된 Raw 264.7 세포를 15 ml의 Krebs buffer 용액(mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na_2HPO_4 0.4, MgCl_2 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl_2 1.8, glucose 5)에 현탁시킨 후 20 μM DCF-DA를 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10^5 cells/ml로 분주하고 lutein과 1 mg/ml silica를 처치한 후 20분간 배양하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 μl 의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광(Ex: 485 nm; Em: 535 nm)을 측정하였다.

자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

Lutein이 체중과 간독성에 미치는 영향

생쥐 체중은 3주간 lutein군과 대조군 모두 유사하였다. 대조군에서 3주간 체중 증가는 25.8 ± 1.1 에서 27.8 ± 1.0 g으로 증가하였으며 lutein군에서는 25.9 ± 1.3 에서 27.4 ± 1.3 g으로 증가하였다. NDEA에 의한 간 독성을 측정하기 위하여 간기능을 나타내는 효소인 AST, ALT와 ALP 활성을 측정하였다. NDEA를 투여하지 않은 대조군과 lutein군 사이에는 별다른 차이가 없었다. 이러한 결과는 lutein이 생체내에서 해로운 작용은 없는 것으로 사료된다. NDEA를 투여시 대조군과 lutein군 모두 효소 활성이 유의하게 증가하였다. 그러나 lutein을 투여한 군은 대조군에 비해 aminotransferase 활성의 증가 정도가 유의하게 감소하였다(Table I). 흰쥐의 간에서 NDEA는 AST와 ALT의 활성이 증가한다는 결과가 이미 보고 된 바가 있다.⁷⁾ Lutein 군에서 NDEA에 의한 간 손상이 적은 것은 lutein이 간세포를 보호하는 작용

Table I – Protective effect of lutein on NDEA (200 mg/kg)-induced liver damage in mice

Parameters	Control		Lutein (50 mg/kg)	
	Saline	NDEA	Saline	NDEA
AST (U/l)	15.0±3.2	58.3±6.8 ^a	14.2±2.5	39.3±4.5 ^{a,b}
ALT (U/l)	14.9±2.5	69.4±5.3 ^a	12.8±3.3	51.3±6.3 ^{a,b}
ALP (U/l)	48.5±6.0	83.3±7.2 ^a	47.2±7.0	65.3±5.3 ^{a,b}

Values are mean±SD; n=8.

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

a: significantly different from saline group ($P < 0.05$).

b: significantly different from corresponding control group ($P < 0.05$)

을 하는 것을 제시할 수 있다. 이러한 결과는 lutein이 diethylnitrosamine에 의한 간암 발생을 억제한다는 결과와 잘 일치하고 있다.²⁰⁾

Lutein이 NDEA에 의한 지질과산화 생성에 미치는 영향

NDEA에 의한 지질과산화는 대조군과 lutein군 모두에서 유의

Table II – The effect of lutein on NDEA (200 mg/kg)-induced oxidative stress in mice

Treatments	Control		Lutein (50 mg/kg)	
	Saline	NDEA	Saline	NDEA
Heart				
LPO	0.24±0.03	0.88±0.08 ^a	0.28±0.09	0.45±0.06 ^b
SOD	4.45±0.34	16.35±1.10 ^a	4.53±0.34	6.83±0.45 ^b
Catalase	178.2±23.8	83.8±12.3 ^a	234.2±34.2 ^b	202.4±23.2 ^b
Lung				
LPO	0.31±0.02	0.56±0.07 ^a	0.25±0.09	0.29±0.03 ^b
SOD	3.75±0.45	12.39±1.23 ^a	4.86±0.73	6.51±0.56 ^b
Catalase	117.3±13.2	73.2±7.1 ^a	170.2±18.2 ^b	132.3±12.5 ^b
Liver				
LPO	0.25±0.05	0.64±0.08 ^a	0.20±0.07	0.36±0.04 ^b
SOD	3.61±0.32	6.20±0.72 ^a	4.42±0.45	4.06±0.43 ^b
Catalase	225.7±20.1	93.2±10.2 ^a	215.6±15.3	154.2±20.7 ^b
Kidney				
LPO	0.29±0.02	0.52±0.06 ^a	0.26±0.02	0.30±0.03 ^b
SOD	3.89±0.41	9.08±1.12 ^a	4.02±0.42	4.56±0.34 ^b
Catalase	193.2±15.8	134.2±13.9 ^a	232.4±18.7 ^b	182.3±20.8 ^b
Spleen				
LPO	0.35±0.02	0.62±0.04 ^a	0.32±0.03	0.34±0.03 ^b
SOD	4.31±0.48	13.04±1.32 ^a	4.38±0.72	4.66±0.45 ^b
Catalase	153.2±14.6	58.4±10.2 ^a	167.3±14.2	112.3±20.5 ^b
Plasma				
LPO	0.36±0.06	0.55±0.05 ^a	0.35±0.03	0.35±0.03 ^b
SOD	3.51±0.31	12.58±1.24 ^a	6.22±0.29 ^b	10.02±1.12 ^b

Values are mean±SD; n=8.

LPO, lipid peroxidation (tissues: µg/mg protein, plasma: µM)

SOD, superoxide dismutase (tissues: U/mg protein, plasma: U/ml).

Catalase (U/mg protein).

a: significantly different from saline group ($P < 0.05$).

b: significantly different from corresponding control group ($P < 0.05$)

하게 증가하였으며, 다른 조직들에 비해 심장에서 가장 많이 증가하였다. Lutein 자체는 NDEA가 없는 상태에서는 지질과산화 생성에 별 다른 영향을 주지 않았다. 그러나 NDEA에 의한 지질과산화 생성은 모든 조직에서 유의하게 억제하였다(Table II). Superoxide anion은 살아있는 생명체에서 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, 또는 singlet oxygen 같은 다른 ROS를 형성하며,²¹⁾ 이는 지질과산화를 유도하여 세포상해를 일으킨다.⁸⁾ 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde는 지질과산화의 지표로 사용하고, thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)로 측정할 수 있다.²²⁾ NDEA에 의한 지질과산화의 증가는 ROS의 생성의 증가 또는 분해의 감소 때문인 것으로 보인다. 그러나 lutein을 처치한 군에서 NDEA에 의한 지질과산화의 영향이 적은 것은 lutein에 항산화 효과에 의한 것으로 생각된다. 지금까지 lutein에 대한 항산화 작용은 *in vivo*와 *in vitro* 상에서 많이 보고되고 있다.^{4,6)}

Lutein이 SOD와 catalase 활성에 미치는 영향

세포내에서 생성된 superoxide는 SOD에 의해 H₂O₂로 전환되고, 이는 다시 peroxidase와 catalase에 의해 무해한 물과 산소로 전환된다.²¹⁾ NDEA로 산화적 스트레스를 유발한 모든 조직에서 SOD 활성은 대조군과 lutein군 모두에서 증가하였다. 대조군의 혈장, 심장, 폐 및 비장에서 NDEA로 유도된 SOD 활성 증가는 간과 신장보다 더 많이 증가하였다. NDEA를 처치하지 않은 조건에서 lutein은 혈장에서 SOD의 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 NDEA에 의한 SOD의 증가는 lutein을 투여한 경우 증가 정도가 유의하게 감소하였다(Table II). 이러한 결과는 lutein이 NDEA에 의한 ROS 생성을 억제하므로써 SOD의 활성증가가 감소한 것으로 사료된다. 이러한 가정은 Raw 264.7 세포에서 lutein이 silica에 의한 ROS 생성을 농도 의존적으로 억제하는 결과로서

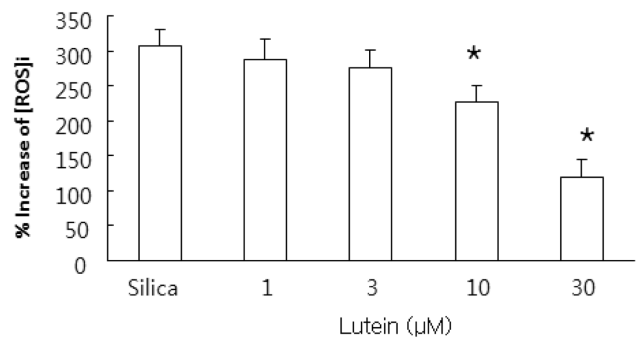


Fig. 1 – Inhibitory activity of lutein on silica-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) production in Raw 264.7 cells. DCF-DA-loaded cells were preincubated with lutein and stimulated with 1 mg/ml silica at 37°C for 20 min. Results are means±SD from 4 separate experiments. * Significantly different from silica ($p < 0.05$).

설명 할 수 있다(Fig. 1). 또한 같은 세포에서 lipopolysaccharide에 의한 ROS 생성도 lutein이 유의하게 억제한다는 보고도 있다.⁶⁾

세포에서 사용한 lutein의 양은 생쥐에서 사용한 용량의 1/10 되는 양으로 동물 실험에서도 50 mg/kg 보다 낮은 농도에서도 유의한 효과가 나타난 것으로 생각된다.

NDEA를 투여하지 않은 lutein군은 심장, 폐 및 신장 조직에서 대조군에 비해 catalase 활성이 유의하게 증가하였다. 그러나 NDEA를 투여시 catalase의 활성은 대조군과 lutein군 모두에서 크게 감소하였다. 한편 NDEA에 의한 catalase의 감소는 lutein을 처치한 군에서 대조군에 비하여 유의하게 적은 것을 볼 수 있다(Table II). Catalase는 호기성 세포에 광범위하게 존재하고 있고 항산화 방어 시스템에서 중요한 물질이다. 이것은 간에 가장 풍부하게 존재하고 H₂O₂가 산소와 물로 분해하는 효소 반응을 담당하고 있다. 이러한 결과는 NDEA를 투여한 쥐에서도 catalase 활성이 감소되는 현상을 관찰하였는데 이는 NDEA에 의한 superoxide anions이 catalase를 불활성화 시키는 것으로 설명되고 있다.^{23,24)} 한편 적혈구에서도 NDEA에 노출되었을 때 과도한 superoxide anion의 형성으로 인해 catalase의 활성이 감소된다는 보고도 있다.²⁵⁾ 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 lutein은 NDEA에 의한 지질과산화 생성과 SOD 활성의 증가 및 catalase의 활성 감소를 대조군에 비해 유의하게 억제하는 것으로 보아 lutein은 체내에서 생성될 수 있는 NDEA에 의한 산화성 스트레스로부터 인체를 보호해줄 수 있는 물질로 제시할 수 있다.

결 론

인체내에서 자연적으로 생성이 가능한 NDEA에 의한 산화성 스트레스를 방어할 수 있는 lutein의 역할을 구명하기 위하여 NDEA를 처치한 생쥐의 다양한 조직에서 지질과산화 생성과 SOD 및 catalase의 활성을 관찰하였다. lutein을 3주간 처치한 군의 체중 변화는 올리브유를 먹인 대조군과 비교시 별다른 차이가 없었다. NDEA를 투여하지 않은 대조군과 lutein군에서 간 기능을 나타내는 효소인 AST, ALT와 ALP 활성은 별다른 차이가 없었다. 그러나 NDEA를 투여시 대조군과 lutein군 모두 효소 활성이 유의하게 증가하였지만, lutein을 투여한 군은 대조군에 비해 aminotransferase 활성의 증가 정도가 유의하게 감소하였다. NDEA는 생쥐에서 지질과산화물의 생성과 SOD 활성을 유의하게 증가시켰다. 이러한 NDEA에 의한 증가는 lutein을 처치시 유의하게 감소하였다. 또한 lutein은 NDEA에 의한 catalase 활성의 저하를 유의하게 감소시켰다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 lutein은 체내에서 생성될 수 있는 NDEA에 의한 산화성 스트레스로부터 인체를 보호해줄 수 있는 물질로 제시할 수 있다.

감사의 말씀

이 논문은 2009년도 중앙대학교 우수연구자 연구비 지원에 의한 것임.

참고문헌

- 1) Yeum, K. J., Taylor, A., Tang, G. and Russell, R. M. : Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 2756 (1995).
- 2) Ascherio, A., Rimm, E. B., Hernan, M. A., Giovannucci, E., Kawachi, I., Stampfer, M. J. and Willett, W. C. : Relation of consumption of vitamin E, vitamin C and carotenoids to risk for stroke among men in the United States. *Ann. Intern. Med.* **130**, 963 (1999).
- 3) Krinsky, N. I., Landrum, J. T. and Bone, R. A. : Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.* **23**, 171 (2003).
- 4) Dwyer, J. H., Navab, M., Dwyer, K. M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Merx, C. N. and Fogelman, A. M. : Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis. *Circulation.* **103**, 2922 (2001).
- 5) Jin, X. H., Ohgami, K., Shiratori, K., Suzuki, Y., Hirano, T., Koyama, Y., Yoshida, K., Ilieva, I., Iseki, K. and Ohno, S. : Inhibitory effects of lutein on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**(6), 2562 (2006).
- 6) Kim, J. H., Na, H. J., Kim, C. K., Kim, J. Y., Ha, K. S., Lee, H., Chung, H. T., Kwon, H. J., Kwon, Y. G. and Kim, Y. M. : The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation. *Free Radic. Biol. Med.* **45**(6), 885 (2008).
- 7) Taniguchi, M., Yasutake, A., Takedomi, K. and Inoue, K. : Effects of N-nitrosodimethylamine (NDMA) on the oxidative status of rat liver. *Arch. Toxicol.* **73**, 141 (1999).
- 8) Spittler, G. : Enzymic lipid peroxidation - a consequence of cell injury? *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 1003 (1996).
- 9) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
- 10) Rana, S. V. S., Allen, T. and Singh, R. : Inevitable glutathione then and now. *Indian. J. Exp. Biol.* **40**, 706 (2002).
- 11) Reitman, S. and Frenkel, S. A. : Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvate transaminases. *Am. J. Pathol.* **28**, 56 (1957).
- 12) Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. : Oxidants,

- antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7915 (1993).
- 13) Beckman, K. B. and Ames, B. N. : The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547 (1998).
- 14) Noguchi, N., Watanabe, A. and Shi, H. : Diverse functions of antioxidants. *Free Radic. Res.* **33**, 809 (2000).
- 15) Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of the superoxide anion radical in the auto-oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469 (1974).
- 16) King, E. J. and Delory, G. E. : The rates of enzyme hydrolysis of phosphoric esters. *Biochem. J.* **33**, 11 (1959).
- 17) Boland, A., Delapierre, D., Mossay, D., Hans, P. and Dresse, A. : Propofol protects cultured brain cells from iron ion-induced death: comparison with trolox. *Eur. J. Pharmacol.* **404**, 21 (2000).
- 18) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **163**, 279 (1987).
- 19) McCune, L. M. and Johns, T. : Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J. Ethnopharmacol.* **82**, 197 (2002).
- 20) Moreno, F. S., Toledo, L. P., de Conti, A., Heidor, R., Jordão, A. Jr., Vannucchi, H., Cardozo, M. T. and Ong, T. P. : Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. *Chem. Biol. Interact.* **168**(3), 221 (2007).
- 21) Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S. and Tamura, Y. : The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med. Hypothesis* **60**, 567 (2003).
- 22) Kohen, R. and Nyska, A. : Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **30**, 620 (2002).
- 23) Bartsch, H., Hietanen, E. and Malaveille, C. : Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their action. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 637 (1989).
- 24) Bansal, A. K., Bhatnagar, D. and Soni, G. L. : *In vitro* effect of N-nitrosodimethylamine on lipid peroxidation and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicol. In vitro.* **10**, 649 (1996).
- 25) Bansal, A. K., Bansal, M., Soni, G. and Bhatnagar, D. : Modulation of NDEA induced oxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* **24**, 297 (2005).