

모유의 항산화능에 관한 연구

김정선 · 심경희 · 김명숙 · 김규원* · 이기영** · 정해영†

부산대학교 약학과

*부산대학교 분자생물학과

**호서대학교 식품영양학과

Study on the Antioxidative Activity of Human Milk

Jung-Sun Kim, Kyung-Hee Shim, Myung-Suk Kim, Kyu-Won Kim*,
Ki-Young Lee** and Hae-Young Chung†

Dept. of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Dept. of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Hoseo University, Ansan 330-180, Korea

Abstract

The antioxidative activity of each fraction in human milk was examined using H_2O_2 and $FeSO_4$ -induced lipid peroxidation of mouse liver homogenate in order to elucidate the antioxidative substances of human milk. High molecular weight ($\sim >20KD$) fraction had more antioxidative effect on lipid peroxidation than low molecular weight ($\sim <20KD$) fraction. Furthermore, the changes of antioxidative enzyme activities were estimated during lactation to study the roles of human milk. The human milk showed high activities of catalase, glutathione (GSH) peroxidase and GSH S-transferase. These results suggest that the antioxidative activities may mostly be attributed to high molecular weight fraction containing catalase, GSH peroxidase and GSH S-transferase.

Key words : antioxidative activity, human milk

서 론

모유는 영양적인 면, 면역학적인 면, 그리고 정서적인 면에서 그 장점에 대한 인식이 나날이 부각되어 가고 있으며 (1-3), 특히 6개월 미만의 영아에게 가장 이상적인 영양소 공급원으로 알려져 있다 (1-4). 포유동물의 종류에 따라 유즙의 성분 함량은 그 동물의 성장 및 발달 양상에 적합하도록 되어 있으며 근래의 생화학적 연구들은 이러한 사실이 모유에게도 적용된다고 증명하고 있다 (5). 모유는 그 분비되는 시기에 따라 분만 후 5~6일 사이의 것을 초유 (colostrum), 10~14일 사이에 분비되는 것을 이행유 (transitional milk), 그 후에 분비되는 것을 성숙유 (mature milk)라고 하며 각각 독특한 특징들을 가지고 있다 (6). 대체로 생후 6개월경까지의 영아는 모유만으로 충분히 발육할 수 있다.

또한 모유에는 각종 효소와 면역체를 함유하고 있음이 밝혀져 있다 (7,8). 모유에 존재하는 단백질로는 크게 casein과 whey protein으로 나뉘며, whey protein은 lactoferrin, immunoglobulin, lysozyme (9-13), α -lactalbumin을 제외하고는 영아의 protein 섭취에 크게 기여하지는 않아도 체내에서 면역체로서 주된 기능을 발휘하고 있다 (14-16). 그외 모유에는 성장촉진인자 (growth promoting factor) (17)와 hormone (18)도 함유되어 있다고 한다.

최근의 여러 보고에 의하면, 모유에는 human epithelial transforming growth factor가 존재하고 있으며 (19) hepatocyte를 증식시키는 mitogenic activity가 있어 신생아 간의 성장과 발달에 관여한다는 보고가 있다 (20). 그외 T-lymphocyte 증식을 자극하거나 억제하는 인자도 존재하여 유아의 면역계를 조절하며 (21), 혈관내피 세포에서 prostaglandin I_2 (PGI₂) 생성을 촉진하기도 하는데 특히 이러한 효과는 우유에는 없다고 한다 (22).

†To whom all correspondence should be addressed

한편으로 분자 또는 원자 최외각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물 즉 free radical로는 superoxide anion radical ($\cdot O_2$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등이 이에 속하며 그의 지방산과 반응할 수 있는 peroxy radical ($ROO \cdot$)이나 alkoxy radical ($RO \cdot$) 등도 포함된다. 이들은 정상적인 대사과정에서도 부수적으로 세포내 과립 (mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성되며 그의 macrophage나 백혈구에서도 생성된다(23). 이들 free radical은 macrophage의 살균작용, 오래된 단백질의 제거 등에 이용되는 물질이나 그 반응성이 매우 크므로 생체에서 유해한 작용을 나타낼 수 있다. 생체는 이들에 대한 항산화제인 glutathione (GSH), GSH peroxidase, GSH S-transferase, superoxide dismutase (SOD), catalase, nonprotein-SH, protein-SH, albumin 등이 존재하여 free radical에 의한 손상을 막아 생체 homeostasis를 유지한다. 만일 어떤 원인으로 free radical 생성이 증가하거나 그들을 제거하는 항산화제의 보호작용이 감소할 경우, 노화, 암, 동맥경화 등 여러 질병이 발생하기도 한다(24). 모유에는 영아의 성장에 필요한 생체 단백질 합성의 질소원 뿐만 아니라 영아의 성장 및 분화에 관여하는 여러 인자가 존재할 것이며, 또 급속한 성장을 위해 많은 에너지가 소모될 것이므로 이에 수반하여 영아 체내 여러 대사과정에서 특히 free radical의 발생이 증가할 것이므로 체내에서는 이에 적응하기 위하여 여러 방어기전이 필요하다. 영아의 경우 항산화물질들이 모유로부터 영아에게 전달이 될 수 있으므로 본 연구에서는 모유의 분획을 20KD 이상과 20KD 이하의 두 부분으로 나누어 지질과산화에 대한 모유의 항산화능을 비교하여 항산화능을 주로 나타내는 분자량대를 규명하고자 하였다. 또한 20KD 이상의 고분자 분획이 함유되어있는 항산화계 효소를 수유 기간별로 검토하였으며, 영아의 성장에 영향을 미치는 항산화계 효소의 수유기간에 따른 그 역할을 조사하였다.

재료 및 방법

유즙의 채취

모유, 이행유, 성숙유는 병원 및 가정에서 채취하였다. 유즙 채취는 1일 중 두번째 수유 시간인 오전 9시에서 12시 사이에 젖 먹이기 전 착유기로 유방의 위치에 관계없이 한쪽 유방의 유즙을 전량 채취하였다. 초유는 분만 후 1일, 이행유는 분만 후 7일, 성숙유는 분만 후 40일에 각각 채취하였다. 그리고 100일에서도

추가로 채취하였다. 착유한 유즙은 즉시 균질화하여 분석시 까지 $-70^\circ C$ 의 냉장고에 보관하였다.

모유의 분획

모유 2.5ml를 Centricut V-20 (Kurabo Co, Osaka, Japan)에 넣고 10,000×g에서 1시간 원심분리하여 상층은 20KD 이상 분자량과, 하층은 20KD 이하 분자량으로 분리하였다.

지질과산화 측정에 의한 모유의 항산화능 실험

모유의 20KD 이상과 20KD 이하의 분획에서 모유 용량 증가에 따른 (5, 25, 125 μ l) 지질과산화 억제 정도를 비교하였다. 흰쥐의 간장을 적출하여 인산완충액 (pH 7.4)으로 균질화하였다. 2.5% 균질액에 시료를 넣지 않은 균을 정상균으로 하고 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 만을 넣은 실험계를 대조군으로 하며 채유 6개월 된 모유를 전처리한 후, H_2O_2 와 $FeSO_4$ 를 첨가한 실험계를 대조군으로 하여 $37^\circ C$, 20min preincubation하여 지질과산화물 유도시켰다. 이때, H_2O_2 와 $FeSO_4$ 의 농도는 각각 10, 0.5nM로 하고 모유를 용량별로 5, 25, 125 μ l씩 처리 후 완충액으로 전체용량을 1.0ml가 되도록 하였다. 이때 완충액은 calcium magnesium free phosphate buffered saline (CMF-PBS)를 사용하였다. 여기에 16.8% trichloroacetic acid 100ml에 416mg의 thiobarbituric acid (TBA)를 가하여 용해시킨 후 6.8mM butylated hydroxytoluene (BHT) 용액을 1ml 가해서 만든 정지액 3.0ml를 가하여 20min간 boiling하고, 3,000×g에서 20min간 원심분리 시킨 후 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

Catalase 환성 측정

50mM 인산완충액 (pH 7.0) 1.5ml에 효소원 100 μ l를 가하고 10mM H_2O_2 용액을 1ml 가하여서 240nm에서 흡광도 변화를 측정하였다(25).

GSH peroxidase 활성 측정

Tappel법(26)에 준하여 측정하였다. 0.01M NaN_3 용액 0.2ml, 0.01M GSH용액 0.2ml, 1.5mM NADPH용액 0.2ml, GSSG-reductase (200U/ml) 0.03ml 및 4mM EDTA 함유 0.1M 인산완충액 (pH 7.0) 2.3ml를 각각 취한 반응액에 효소원을 가하여 5분간 preincubation 시킨 후 5.0mM H_2O_2 0.1ml를 가하고 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

GSH S-transferase 활성 측정

Habig 등의 방법 (27)에 준하여 2.5nM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 1ml, 5mM glutathione용액 0.5ml, 0.25 mM 인산완충액 (pH 6.5)를 각각 취한 반응액을 25°C에서 5분간 preincubation시킨 후 효소원을 가하여 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

Protein-SH 농도 측정

0.2M tris buffer (pH 8.2) 1ml, 0.01M DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 0.1ml, methanol 4ml를 취한 후, 여기에 10% 모유 0.1ml를 취하여 24°C, 15분간 방치하였다. 이것을 600×g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 412nm에서 흡광도를 측정하여 total-SH 농도를 측정하였다. Total-SH 값에서 nonprotein-SH 값을 제외하여 protein-SH 값을 구하였다 (28).

Non-protein-SH 농도 측정

Saville법 (29)에 의해서 측정했으며, 10% 모유에 동량의 10% trichloroacetic acid 용액을 가하여 원심분리한 상등액을 시료로 하였다. 시료 0.1ml에 0.01M의 NaNO₂ 1 vol과 0.2N H₂SO₄ 9 vol을 혼합 제조하여 0.5ml를 가한 다음에 5분간 방치시켰다. 0.5% sulfamic acid ammonium 수용액 0.2ml를 가하여 강하게 혼화한 후 1% HgCl₂ 1 vol과 3.4% sulfanilamide/0.4N HCl 9 vol 혼액을 1ml 가하였다. 그리고 0.1% N-1-naphthylethylenediamine/0.4N HCl용액을 가하고 5분 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로서 125nM glutathione용액을 사용하였다.

결 과

모유분획의 항산화능

채유 6개월의 모유를 분획하여 상층(고분자분획 : 분자량 20KD 이상)과 하층(저분자분획 : 분자량 20 KD 이하)으로 나누고 각 분획의 항산화능을 malondialdehyde(MDA)량을 측정하여 비교 검토한 결과, Fig. 1에서는 상층, 즉 고분자분획을 5, 25, 125μl씩 용량별로 증가시킬 때 지질과산화 억제 정도가 대조군에 비해 각각 46, 81, 90%로 현저히 용량의존적으로 지질과산화를 억제시켜 강력한 항산화작용을 나타내었다. 또한 하층, 즉 저분자분획에서는 모유를 5, 25, 125μl씩 용량별로 증가시킬 때 대조군에 비해 각각 15, 35, 49%로 용량의존적으로 지질과산화를 억제시켜 강력한 항산

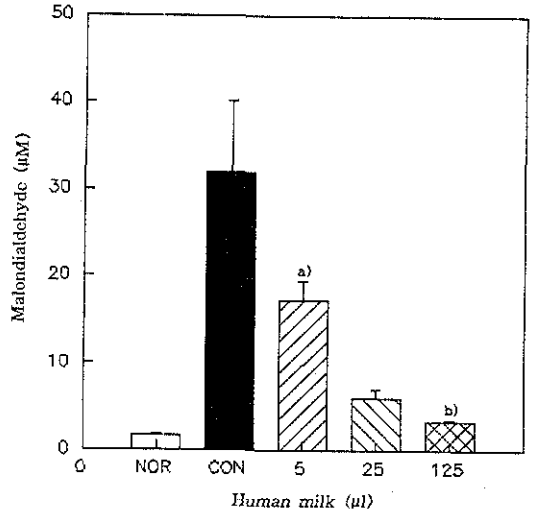


Fig. 1. Effect of high molecular weight(>20KD) fraction of human milk on lipid peroxidation induced by FeSO₄ and H₂O₂ system. NOR : normal, CON : control. Values are means±S.D. Statistical significance : a) p<0.05 vs. control group, b) p<0.001 vs. control group.

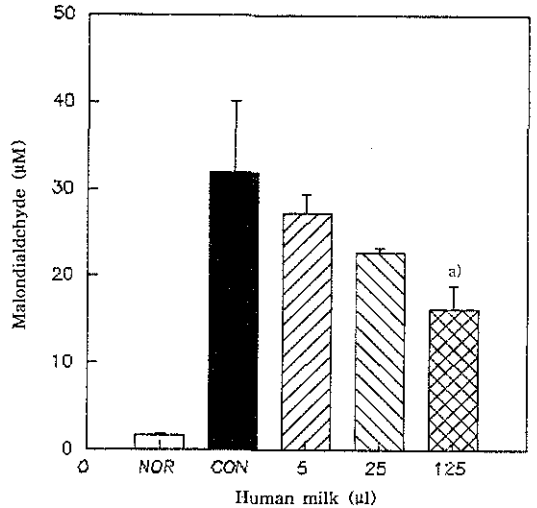


Fig. 2. Effect of low molecular weight(20KD>) fraction of human milk on lipid peroxidation induced by FeSO₄ and H₂O₂ system. NOR : normal, CON : control. Values are means±S.D. Statistical significance : a) p<0.05 vs. control group.

화작용을 나타내었다 (Fig. 2).

이상의 결과에서 모유의 용량별 증가에 따른 지질과산화의 억제 정도는 고분자분획 (20KD 이상의 분획)인 상층에서 더욱 현저하였으므로 모유의 지질과산화능은 분자량이 20KD 이상에 존재하는 항산화효소에 기

인될 것으로 사료되었다.

채유기간별 모유의 catalase 활성

Fig. 3은 채유일에 따라 각 모유의 catalase 활성을 나타내었다. 1일째 모유의 경우 3.78mU/mg protein, 7일째 모유의 경우 0.34mU/mg protein, 20일째 모유의 경우 0.5mU/mg protein, 40일째 모유의 경우 1.20mU/mg protein, 100일째 모유의 경우 0.39mU/mg protein으로 1일째 모유에 비해 7일째 모유의 경우 현저히 감소한 후 차츰 증가하는 경향을 보인다 100일째 모유는 다시 7일째 모유의 값으로 저하하였다.

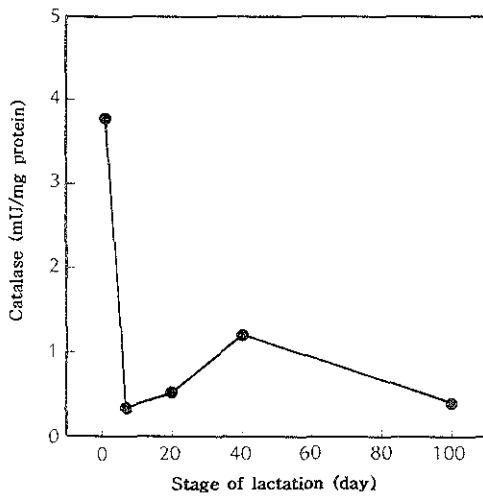


Fig. 3. Catalase activity in human milk during lactation period.

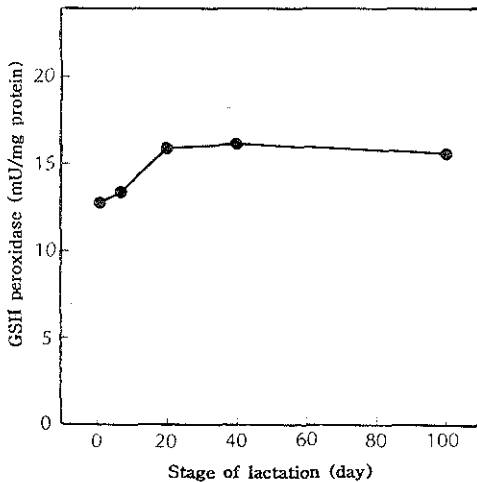


Fig. 4. Glutathione peroxidase activity in human milk during lactation period.

채유기간별 모유에 대한 GSH peroxidase 활성

Fig. 4에 나타낸 바와 같이 채유기간에 따른 모유의 GSH peroxidase의 활성을 검토한 결과, 1일째 모유의 경우 12.77mU/mg protein, 7일째 모유의 경우 13.38mU/mg protein, 20일째 모유의 경우 15.88mU/mg protein, 40일째 모유의 경우 16.12mU/mg protein, 100일째 모유의 경우 15.38mU/mg protein으로 20일째 까지 증가하다 그 후 큰 변화없이 다시 20일째 수준으로 유지되었다.

채유기간별 모유의 GSH S-transferase 활성

Fig. 5에 나타낸 바와 같이 GSH S-transferase의 채유기간별 모유에서의 활성은 1일째 모유의 경우 964.29 mU/mg protein, 7일째 모유의 경우 1610.84mU/mg protein, 20일째 모유의 경우 147.01mU/mg protein, 40일째 모유의 경우 1215.57mU/mg protein, 100일째 모유의 경우 981.34mU/mg protein로 채유 초기 7일 까지 급격히 증가하다 그 후 차츰 감소하는 경향을 나타내었다.

채유기간별 모유의 protein-SH 농도

Fig. 6과 같이 채유기간에 따른 모유 중의 protein-SH의 농도는 1일째 모유의 경우 201.99mM, 7일째 모유의 경우 145.99mM, 20일째 모유의 경우 174.97mM, 40일째 모유의 경우 156.99mM, 100일째 모유의 경우 111.99mM로 1일째에서 가장 높은 수치를 나타내었으며 그 후 차츰 감소하였다.

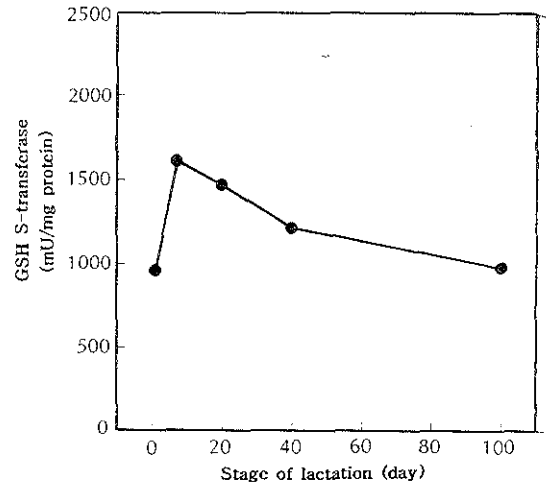


Fig. 5. Glutathione S-transferase activity in human milk during lactation period.

고 찰

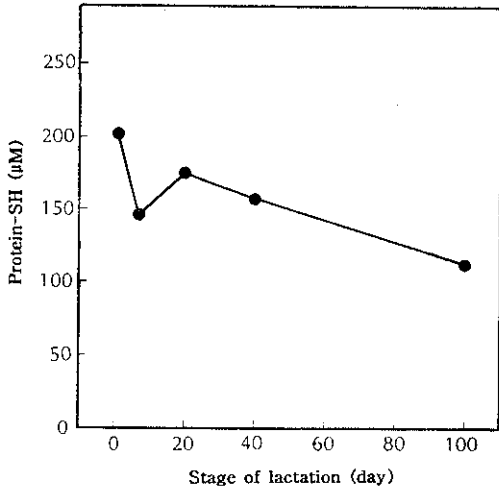


Fig. 6. Protein-SH concentration in human milk during lactation period.

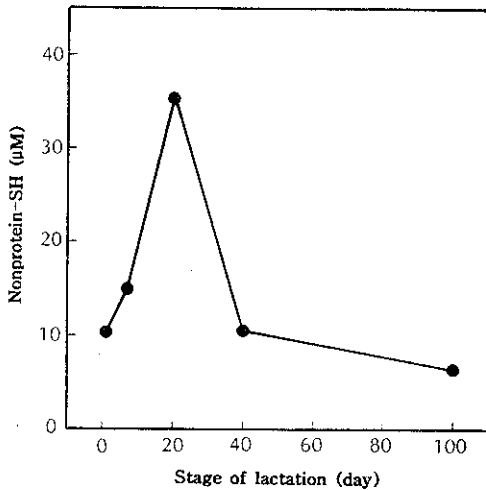


Fig. 7. Nonprotein-SH concentration in human milk during lactation period.

채유기간별 모유의 nonprotein-SH 농도

Fig. 7에 나타낸 바와 같이 채유 기간에 따른 모유의 nonprotein-SH 농도는 1일째 모유의 경우 10.41mM, 7일째 모유의 경우 15.02mM, 20일째 모유의 경우 35.34 mM, 40일째 모유의 경우 10.60mM, 100일째 모유의 경우 6.48mM로 채유 초기에 급격히 증가하여 채유 20일 경에 가장 높고 그 후 감소하여 100일째 모유의 경우에는 다시 1일째 모유의 경우 보다 낮은 값을 나타내었다.

모유는 신생아의 빠른 성장, 분화 및 성숙에 대해 이상적인 영양물의 배합으로 신생아에게 가장 최적이며 유일한 식이로 여겨지고 있다. 모유는 신생아에게 적절한 영양 뿐만 아니라 수동면역도 제공하여 food allergy에 대한 보호역할도 한다. 모유에서 영아에게 이행되는 면역체로 immunoglobulin A, lactoferrin, lysozyme 등은 현재 모유에서 확인되어 있으며 그외 mineral이나 비타민 등의 함유로 모유의 가치를 더욱 증폭시켜 주고 있다. 그러나 모유에 함유되어 있는 많은 성분들이 동정되었다 해도 그들의 체내에서의 구체적인 역할과 의의에 대해서는 아직 분명하지 않다.

영아는 특히 성장이 빠르므로 그에 따른 급격한 energy 대사에서 산소이용률이 성인 못지않게 클 것이며 그 ATP 소모에 따른 여러 oxidative stress가 성인에 비해 더욱 클 것으로 예상된다. 영아의 면역계 등 여러 방어계가 성인 보다 미숙하다 해도 그들의 대사율과 여러 성장률을 볼 때 영아의 oxidative stress에 대한 방어계는 성인 못지않게 유지되어야 할 것이다.

본 연구에서는 신생아에서 효과적으로 존재할 것으로 여겨지는 여러 방어기구가 모체에서 모유로 이행될 수 있을 것이므로 모유속의 여러 항산화인자들을 채유 기간별로 검토하였다. 그 결과 대체로 채유 기간별로 항산화 인자들의 활성이 catalase를 제외한 GSH S-transferase 및 GSH peroxidase는 7일째를 전후로 채유 초기에 증가한 후 차츰 감소하는 경향을 나타내었다.

많은 유기체내의 방어기능은 반응성 산화물질의 양과 그들에 대한 손상을 방어하는 물질들의 양에 의해 결정된다. 이들 방어기구의 이상으로 oxidative stress는 여러 조직에 손상을 초래할 수 있다. 산소는 생명유지에 필수불가결하지만 산소호흡 시 부수적으로 생성되는 free radical은 그 반응성이 커서 어떤 요인으로 생체내에서 이들의 생성이 많아지거나 이들에 대한 제거능이 감소되는 경우, 지질과산화, 단백질 산화, DNA 손상 등을 초래하여 세포 손상 및 조직 손상을 초래하고 그 외 여러 질병을 유발한다. 영아에서는 이들에 대해 효과적인 방어계가 존재할 것이며, 영아일수록 그 방어기구가 효과적으로 수행될 수 있도록 하기 위하여 모유를 통해서 영아에 전달될 가능성도 있다. 이는 영아에 있어서 항체가 모유를 통해서 영아에 전달되는 것과 유사할 것이다.

모유속의 항산화 인자를 검토한 본 실험에서 FeSO₄와 H₂O₂로 일으킨 지질과산화에 의해 생성되는 MDA

측정의 경우, 모유에서는 용량별 증가에 따라 20KD 이상과 이하의 두 분획 모두에서 지질과산화 억제 정도가 강하게 나타났으며, 주로 20KD 이상의 상층에서 더욱 뚜렷하였다. 이는 모유의 항산화력이 주로 20KD 이상의 고분자 단백질인 항산화효소에 기인할 가능성이 시사되었다. GSH S-transferase는 세포질 GSH S-transferase로 대별되는데 양 GSH S-transferase는 대부분 생체 전조제에 함유되어 있으며, 특히 간에서 최고의 함량을 나타낸다(30). 세포질 GSH S-transferase의 체내 중요한 역할 중의 하나는 친전자성 발암물질의 활성화 대사를 해독작용으로서(31), 발암물질은 생체내에서 cytochrome P-450이나 phosphotransferase(32) 등 각종 약물대사효소에 의해 활성화되어 DNA 손상을 일으키지만 GSH S-transferase는 이들 소수성 잔기를 가지는 활성화대사물(R-X)을 기질로, 여기에 GSH를 공유결합시켜 R-SG의 안정화된 형태를 만들며 최종적으로 N-acetyl conjugate로 뇨 중 배설시키는 최종 단계의 반응을 촉매한다는 사실이 널리 알려져 있다. 또한 selenium 결핍증 흰쥐의 간에서 나타나는 selenium 함유 GSH peroxidase의 결손시 세포질 GSH S-transferase 활성이 증가하는 것은 GSH S-transferase가 GSH peroxidase의 대체 역할을 하고 있다고 볼 수 있다(33). GSH peroxidase는 selenium에 의존적이며 catalase에 의해 대사되지 않고 생체내에서 지질과산화를 일으키는 t-butylhydroperoxide를 대사시키는 주된 효소이다(34).

본 연구에서는 GSH S-transferase 및 GSH peroxidase 활성이 모유의 채유 기간별로 증가하여 영아가 받는 oxidative stress에 대한 방어 효과와 관련성이 있을 것으로 시사되었다.

생체내에서 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제인 SOD, catalase, GSH peroxidase, GSH, protein-SH, nonprotein-SH, albumin 등의 변화는 그 작용 발현기전이 다음 두가지로 분류될 수 있다. 첫째는 free radical 발생을 미연에 방지하는 계이고, 두번째는 생성된 radical을 포착, 제거하는 계이다. 그 예로써 생체내 항산화제가 과산화지질의 생성을 억제하는 것을 보면 GSH peroxidase, catalase 등의 작용은 지질 hydroperoxide나 H₂O₂의 분해로부터 RO· 및 ·OH 등의 지질과산화 유도물질의 생성을 억제하는 예방적 산화기구에 해당한다. 또한, 비타민 E, 비타민 C, uric acid, SOD 등은 지질 ROO·, ·OH, ·O₂⁻를 포착하여 지질과산화 유도반응을 제거하거나 ROO·를 포착하여 지질과산화물 억제시키는 항산화 작용을 나타낸다(35). 세포내 H₂O₂를 제거하는 효소인 catalase는 생체내 모든 기관에 존재

하나 특히 간장과 적혈구에 많으며 대개 peroxisome 내에 존재하는 것으로 알려져 있다(36). Catalase 활성의 경우 Semsei 등(37)과 Sohal 등(38)은 노화에 따라 catalase 활성이 감소함을 보고한 바 있다.

GSH를 포함한 nonprotein-SH와 protein-SH는 세포의 유지 및 생존에 필수적인 요소로서, 특히 GSH은 방어기구 즉 방사선 장애의 방어, 세포막 유지, 효소의 -SH기 유지, 이물질의 해독 등 생명유지에 중요한 역할을 하고 있다. 본 실험에서는 모유 중 존재하는 nonprotein-SH와 protein-SH의 양을 채유 기간별로 검토한 결과 채유 기간에 따라 대체로 증가하는 경향을 나타내었다.

결론적으로 모유는 FeSO₄ 및 H₂O₂에 유도된 지질과산화에 대하여 강력한 항산화력을 나타내었으며, 이러한 현상은 모유속에 함유되어있는 GSH peroxidase, GSH S-transferase, protein-SH 및 nonprotein-SH 등의 항산화물질에 기인하는 것으로 사료된다.

요 약

모유성분을 고분자분획(20KD 이상 분자)과 저분자분획(20KD 이하 분자)으로 나누어 항산화력을 검토한 결과, 고분자분획이 저분자분획 보다 더 강력한 항산화력을 나타내었다. 이 모유의 항산화력은 주로 20KD 이상에 존재하는 항산화 효소에 기인할 가능성이 시사되어 모유의 채유 기간에 따른 항산화 효소를 비롯하여 protein-SH와 nonprotein-SH를 검토한 결과, catalase는 7일째 현저히 저하한데 비해 GSH peroxidase, GSH S-transferase는 7일째를 전후로 현저히 증가한 후 감소하는 경향을 나타내었다. Protein-SH는 채유 기간에 따라 차츰 감소하였으나 nonprotein-SH는 20일째 peak를 이루고 그 후 감소하였다. 이상의 결과로부터 모유의 고분자분획은 강력한 항산화력을 나타내었으며, 이 항산화력은 catalase, GSH peroxidase 및 GSH S-transferase 등의 항산화 효소 활성화에 기인할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 제 2차 파스퇴르 모유연구회 연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 심심한 감사를 드립니다.

문 헌

1. Worthington-Roberts, B. S. : Lactation and human milk. In "Nutrition in pregnancy and lactation" Wor-

- thington-Robert, B. S., Vermeersch, J. and William, S. R. (eds.), 3rd., Mosby Co., St. Louis, p.236 (1985)
2. Martinez, G. A. and Nalezienski, J. P. : The recent trend in breast-feeding. *Pediatrics*, **64**, 686 (1979)
 3. Martinez, G. A. and Krieger, F. W. : Milk-feeding partners in the United States. *Pediatrics*, **76**, 1004 (1985)
 4. Orga, S. S. and Ogra, P. L. : Immunologic aspects of human colostrum and milk. *J. Pediatr.*, **92**, 546 (1978)
 5. Blanc, B. : Biochemical aspects of human milk-comparison with bovine milk. *Wld. Rev. Nutr. Diet*, **36**, 1 (1981)
 6. Renner, E. : Micronutrients in milk and milk-based food products. Elsevier Applied Science, London and New York, p.125 (1989)
 7. Hurrell, R. F., Berrocal, R., Neeser, J.-R., Schweizer, T. F., Hilpert, H., Traitler, H., Colarow, L. and Lindstrand, K. : Micronutrients infant formula. In "Micronutrients in milk and milk-based food products" Renner, E. (ed.), Elsevier Science Publishers, New York, p.239 (1989)
 8. 이무환 : 생활주기 영양학. 동명사, 서울, p.158 (1988)
 9. 김성익, 나창수 : 모유내 편역글로부린의 양적 측정. *소아과*, **25**, 7 (1982)
 10. Lonnerdal, B., Forsum, E., Gebre-Medhin, M. and Hambraeus, L. : Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. II. Lactose, nitrogen, and protein contents. *Am. J. Clin. Nutr.*, **29**, 1134 (1976)
 11. Nagasawa, T., Kiyosawa, I. and Kuwahara, K. : Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.*, **55**, 1651 (1972)
 12. Lonnerdal, B., Forsum, E. and Hambraeus, L. : Longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. *Am. J. Clin. Nutr.*, **29**, 1127 (1976)
 13. Lonnerdal, B., Forsum, E. and Hambraeus, L. : The protein content of human milk. I. A transversal study of Swedish material. *Nutr. Rept. Inter.*, **13**, 125 (1976)
 14. Gaull, G. E., Jensen, R. G., Rassin, D. K. and Malloy, M. H. : Human milk as food. *Advan. Perinat. Med.*, **2**, 100 (1982)
 15. Worthington-Roberts, B. S., Vermeersch, J. and Williams, S. R. : Nutrition in pregnancy and lactation. 3rd ed., Mosby Co., p.236 (1985)
 16. Lonnerdal, B. : Biochemistry and physiological function of human milk protein. *Am. J. Clin. Nutr.*, **42**, 1299 (1985)
 17. Klagsbrun, M. : Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **75**, 5057 (1978)
 18. Koldovsky, O. : Hormones in milk. *Life Sci.*, **26**, 1833 (1980)
 19. Dunnington, D. J., Scott, R. G., Anzano, M. A. and Greig, R. : Characterization and partial purification of human epithelial transforming growth factor. *J. Cell Biochem.*, **44**, 229 (1990)
 20. Kohno, Y., Shiraki, K. and Mura, T. : The effect of human milk on DNA synthesis of neonatal rat hepatocytes in primary culture. *Pediatr. Res.*, **29**, 251 (1991)
 21. Mincheva, N. L., Hammarstrom, M. L. and Hammarstrom, S. : Human milk contains proteins that stimulate and suppress T lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.*, **79**, 463 (1990)
 22. Ristimaki, A., Ylikorkala, O., Pesonen, K., Perheentupa, J. and Viinikka, L. : Human milk stimulates prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol.-Metab.*, **72**, 623 (1991)
 23. Corfran, R. S., Kumar, V. and Robbins, S. L. : Robbins pathologic basis of disease. Saunders, Philadelphia, p.1 (1989)
 24. Chung, H. Y. and Kim, Y. K. : Age-associated alteration in the hepatic superoxide generation and antioxidant activities in the senescence-accelerated mice. *Yakhak Hoeji*, **36**, 460 (1992)
 25. Chance, B. and Maehly, A. C. : Assay of catalase and peroxidase. Vol. II, Academic Press, p.764 (1955)
 26. Masaki, N., Kyle, M. E. and Farber, J. L. : t-Butylhydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 390 (1989)
 27. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974)
 28. Sedlak, J. and Lindsay, R. H. : Estimation of total protein-bound and non protein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, **25**, 192 (1968)
 29. Hihashi, T. : Critical review on the determination of glutathione in biological preparation. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **33**, 1370 (1988)
 30. 土田成記, 佐藤清美 : Glutathione S-transferase isozyme, glutathione 研究의 에폭크. 蛋白質, 核酸, 酵素, 臨時增刊, **33**, 1564 (1988)
 31. Sakamoto, Y. and Kinoshita, S. : Glutathione의 生理活性. In "Glutathione". 3rd ed, 講談社, 東京, p.5 (1988)
 32. Watabe, T., Ishizuka, T., Isobe, M. and Wzawa, N. : 7-Hydroxymethylsulfate ester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Science*, **215**, 403 (1982)
 33. Sevanian, A., Muakkash-kelly, S. F. and Montestraqe, S. : The influence of phospholipase A₂ and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 441 (1983)
 34. Benedetti, A., Fulceri, R. and Comporti, M. : Inhibition of calcium sequestration activity of liver microsomal lipids. *Biochem. Biophys. Acta*, **793**, 489 (1984)
 35. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**, 1 (1984)
 36. Barry, H. and John, M. C. G. : Free radicals in biology and medicine. Clarendon press, Oxford, p.86 (1989)
 37. Semsei, I., Roc, G. and Richardson, A. : Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **620**, 164 (1989)
 38. Sohal, R. S., Arnold, L. and Orr, W. C. : Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Aging Dev.*, **223**, 56 (1990)