

Rat에 caffeine 경구투여후 시간경과별로 혈액과 간조직에서 혈액화학성분, 지질 및 단백질 구성성분의 변화

도재철·허린수*

경상북도 가축위생시험소
경북대학교 수의과대학*
(1996년 5월 16일 접수)

Changes of the blood chemistry, lipid and protein components in blood and liver tissue according to the time lapsed of the rat after oral administration of caffeine

Jae-cheul Do, Rhin-sou Huh*

*Kyungpook Veterinary Service Laboratory
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University**
(Received May 16, 1996)

Abstract : This study was conducted to identify the effects of caffeine on the lipid and protein components or blood chemistry levels of the serum as well as the total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of the rat(Sprague-Dawley, female) liver.

Acute test were conducted to determine those effects. The acute test was conducted by dividing rats into 7 groups according to the time lapsed after a single oral administration of 100mg/kg caffeine(that is control, 2hrs, 4hrs, 8hrs, 24hrs, 48hrs and 72hrs lapsed group).

The concentrations of glucose, urea nitrogen, uric acid, creatinine, total protein, albumin, A/G ratio, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, free fatty acid, phospholipid as well as the activities of alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) and alkaline phosphatase(ALP) were measured in the serum of each experimental groups.

The concentrations of the carbonyl group, malondialdehyde(MDA) and the patterns of the SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) were analyzed to determine the oxidative damages and metabolic changes on the lipid and protein components in the serum, and total homogenate, mitochondrial and microsomal fractions of the rat liver.

The results obtained from this study were summarized as follows;

1. The concentrations of serum glucose were significantly higher($p < 0.01$) between 4(143.0mg/dl) and 8hrs(138.0mg/dl) in comparison to that of the control(101.1mg/dl) after a single oral

administration of caffeine(100mg/kg). While on the other, there were no significant differences in the concentrations of urea nitrogen, uric acid, creatinine, total protein, albumin and albumin/globulin(A/G) ratio in comparison to those of the control.

2. The concentrations of total cholesterol and HDL-cholesterol in serum were significantly higher($p<0.01$) between 4(77.4mg/dl, total cholesterol) and 8hrs(64.7mg/dl, HDL-cholesterol) in comparison to those of the control(62.8, 46.7mg/dl) after a single oral administration of caffeine (100mg/kg). On the other hand, the concentrations of triglyceride in serum were significantly lower($p<0.01$) after 8hrs(38.8mg/dl) in comparison to that of the control(66.5mg/dl).

3. The activities of AST in serum was significantly higher($p<0.05$) from 2hrs(149U/L) to 8hrs (178U/L) in comparison to the control(112U/L) after a single oral administration of caffeine (100mg/kg). The activities of ALT in serum were significantly higher($p<0.01$) at 4(45.5U/L), 24(49.3U/L), 48(46.8U/L) and 72 hrs(42.3U/L) in comparison to that of the control(39.7U/L) after a single oral administration of caffeine(100mg/kg). On the other hand, there were no significant differences in the activities of ALP in comparison to that of the control.

4. The concentrations of free fatty acid in serum were significantly higher($p<0.01$) at 8hrs(65.0mg/dl) in comparison to that of the control(37.6mg/dl) after a single oral administration of caffeine(100mg/kg). However, there were no significant differences in the concentrations of carbonyl group and malondialdehyde within serum, and liver homogenate, mitochondrial and microsomal fractions in comparison to that of the control.

5. The patterns of SDS-PAGE in serum, mitochondrial and microsomal fraction of the liver showed no significant differences.

Key words : caffeine, blood chemistry, free fatty acid, phospholipid.

서론

Caffeine(1,3,7-trimethylxanthine)은 여러 식물조직에 존재하는 alkaloid로서 커피, 홍차, 코코아, 초콜릿과 콜라와 같은 여러 식품과 음료 등에 함유되어 있고 인류역사상 오래동안 전세계적으로 널리 이용되고 있으며^{1,14,30,31,55}, 또한 caffeine은 동물조직에서 adenine과 guanine의 중간 대사산물로 생성되는 물질로 동물체내에 투여시 다양한 약리작용과 더불어 탄수화물, 지질 및 아미노산 대사에 영향을 미치게 된다^{10,31,42,55}.

Caffeine은 adipose tissue에서 cAMP phosphodiesterase (cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate 3'-phosphohydrolase)의 활성을 억제시킴으로써 cAMP가 5'AMP로 분해되지 못하여 cAMP가 축적되고, caffeine이 adenosine의 adenylyl cyclase 활성 억제작용을 차단하여 ATP로부터 cAMP로의 전환을 촉진하여 cAMP가 많이 생성됨으로써

hormone-sensitive triacylglycerol lipase를 activation시켜 triacylglycerol로부터 lipolysis를 촉진시키는 작용을 한다^{9,11,16,17,42,56}. 또한 축적된 cAMP는 cAMP dependent protein kinase를 활성화시킴으로써 phosphorylase kinase b(inactive)를 phosphorylase kinase a(active)로의 전환을 촉진시켜 glycogen의 비환원 말단으로부터 glucose를 유리시키는 phosphorolysis의 과정을 거치게 된다^{20,41,42}.

또한 caffeine에 의해 triglyceride로부터 lipolysis가 촉진되어 유리된 free fatty acid는 혈액으로 흡수되며 혈액 내 free fatty acid는 간장으로 운반되어 acetyl-CoA로 전환되고, 일부는 다시 esterification되어 acylglycerol로 되어 VLDL(very low density lipoprotein)과 결합하여 혈액으로 유리되며, 나머지 일부는 carnitine palmitoyl transferase I에 의해 mitochondria 막을 통과한 후 β oxidation 과정을 거치게 되고 그중 일부는 acetyl-CoA로 대사되어 ketone body를 유리하는 ketogenesis의 과정^{33,42,43}을 경유하게 된다.

Gilboe²³는 rat와 Kasvinsky 등³⁵은 소와 토끼에서 caffeine에 의해 유도된 liver glycogen synthase phosphatase activity의 활성촉진 효과에 glucose와 caffeine과의 협동작용은 없었다고 보고하였으며 Patwardhan 등⁵⁰은 사람에게 caffeine 투여시 혈액내 free fatty acid 함량이 증가하였다고 보고하였다. 또한 Peter 등⁵¹은 male, female rat에 매일 caffeine 185mg/kg을 투여하니 치사율에 대한 감수성은 연령이 증가할수록 높았다고 했으며, Naismith 등⁴⁵은 rat에 동결건조된 커피를 54일 동안 급여한 결과 혈액내 cholesterol과 phospholipid 함량이 증가하였으나 triglyceride 함량은 오히려 감소하였으며, sucrose를 추가로 급여하니 triglyceride 함량은 오히려 증가한 반면에 cholesterol과 phospholipid 함량에는 변화가 없었다고 보고하였다. Bellet 등⁶은 개에 caffeine sodium benzoate를 정맥내로 투여한 후 blood clotting parameter와 혈액내 free fatty acid를 조사한 결과 투여 70-90분 사이에 free fatty acid가 증가하였고 투여 4시간째에 가장 증가하였으며, *In vitro* 실험에서 caffeine투여 2시간 30분에서 4시간 사이에 heparin tolerance time과 plasma의 recalcification time 및 one-stage prothrombin time이 유의성 있게 짧아졌다고 비교분석하는 등^{21,54} 지금까지 caffeine에 대한 많은 연구가 행해지고 있다^{2,15,18,39,44,52}.

본 실험에서는 caffeine을 1회 경구투여한 후 시간경과별로 혈액내에서 혈당, 중성지방 및 기타 지질성분의 농도변화와 지질과산화물의 생성여부를 조사하고, 아울러 혈액과 간조직 그리고 간세포 소기관내에서 carbonyl group과 malondialdehyde의 농도변화를 조사하여 caffeine 투여가 동물체내 혈액화학적치와 지질 및 단백질 구성성분에 미치는 영향을 관찰해보고자 본 실험을 수행하게 되었다.

재료 및 방법

실험동물 : 생후 10-12주된 체중 180g내외의 건강한 Sprague-Dawley계 female rat 70마리를 사용하였으며, 실험기간중 시판 실험동물용 고형사료(삼양유지사료) 및 물을 무제한 급식하면서 실험에 사용하였다.

투여약제 및 사용시약 : 실험동물에 투여된 caffeine은 Sigma 제품을 사용하였으며 혈청내 total protein, albumin, glucose, triglyceride, HDL-cholesterol, total cholesterol, urea nitrogen, uric acid, creatinine과 aspartate aminotransferase(AST,

GOT), alanine aminotransferase(ALT, GPT), alkaline phosphatase(ALP)의 효소활성도 측정은 (주)영동제약(서울시 중구 신당동 288-14) 측정 kit를 이용하였으며, 기타 분석에 사용된 모든 시약은 특급을 사용하였다. 아울러 분석에 이용된 증류수는 18MΩ 이상의 초순수 증류수를 이용하여 분석하였다.

실험군 배치 및 실험동물에 약제투여 방법 : 실험군 배치는 caffeine(100mg/kg body weight)을 1회 손데(sonde)를 이용하여 경구(위내강제)투여후 시간경과별로 대조군, 2, 4, 8, 24, 48, 72시간 경과의 7개군으로 나누었으며 각 군별로 rat(Sprague-Dawley strain, female) 10마리씩 총 70마리 배치하였으며, 본 실험에 배치된 rat는 각 실험군별로 명진기계상사 제품의 polycarbonate cage(26×42×18cm)에 3내지 4마리씩 넣어 사육 cage를 완전히 임의로 배치하여 실험을 수행하였다.

모든 실험동물은 실험개시 15시간 전부터 절식(물만 공급)시킨후 실험에 들어갔으며, 실험군별 투여약제 제방법으로 대조군은 생리식염수를, caffeine 투여군은 caffeine을 생리식염수에 5%의 농도로 용해시킨 다음, 실험군별로 체중을 측정하여 체중 kg당 caffeine을 100mg 경구투여되도록 손데(sonde)를 이용하여 rat의 위내로 강제투여하는 방법을 사용하였다.

분석시료 채취 및 분리

1) **혈액 및 간장 채취** : 실험군별로 일정시간이 정확히 경과된 후 신속히 rat를 diethyl ether에 흡입마취시킨 후 간장을 분리하고, 혈액은 후대정맥에서 채취하여 vacuject tube(녹십자 제품)에 넣은후 혈청을 분리(Hettich Universal 2S, 500g에서 10분)한 다음 -60℃ 초저온냉동고(Forma Bio-Freezer)에 분석시까지 냉동보관하였다⁶⁹.

2) **Total homogenate, mitochondria 및 microsome 분리** : 우선 적출된 간장은 10mM phosphate buffer로 perfusion 시킨 후에 실험재료로 사용하였으며, total homogenate는 10mM phosphate buffer로 10% 균질액(weight/volume)을 만들어 사용하였다. Mitochondria 및 microsome 분리는 Hogeboom²⁹의 방법에 따라 우선 sucrose medium(0.25M sucrose, 10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA pH 7.2)에 넣어 10% 균질액을 만든 다음 1,000g에서 15분간 원심분리후 상층액을 취하여 10,000g(Beckman SW 28Ti)에서 15분간 원심분리후에 침전된 mitochondria 분획을 얻었으며, 남은 상층액을 100,000g(Beckman SW 41Ti)에서 60분간 원심분리하여 microsome 분획을 얻었다.

검사항목 및 분석방법 :

1) 혈액 화학성분 분석 :

(1) 혈청내 glucose, creatinine, uric acid, urea nitrogen, total protein 및 albumin 함량은 측정kit(영동제약)를 이용하여 Shimadzu Model UV-160A UV-Visible Spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

(2) 혈청내 triglyceride, HDL-cholesterol, total cholesterol 은 측정 kit(영동제약)를 이용하여 항목별로 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

(3) 혈청내 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase(ALP)도 측정kit(영동제약)를 이용하여 흡광도를 측정하여 효소의 활성치를 계산하였다.

(4) 혈청내 유리지방산 및 인지질 함량분석은 Hanahan 등²⁴ 및 허 등⁶⁶의 방법에 따라 혈청내에서 추출한 지질에서 N₂로 용매를 증발시킨 후 잔사물에 chilled acetone을 가하여 원심분리 후에 유리지방산과 인지질을 각각 분리한 다음 toluene에 용해시켜 copper reagent를 가하여 구리염을 형성시켜 원심분리후 상층액을 분취하여 발색제인 0.1% sodium diethyldithiocarbamate를 가하여 발색시킨 후 440nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

2) 혈청, 간조직 및 간세포 분획내 malondialdehyde 함량측정 : 혈청과 간균질액 및 간세포 분획내 malondialdehyde 함량측정은 Ohkawa 등⁴⁹ 및 Slater 등⁵⁸의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 일정량의 시료(mg protein에 해당하는 량)에 0.2ml의 8.1% sodium dodecyl sulfate 수용액과 1.5ml의 20% acetic acid(pH 3.5)와 1.5ml의 0.8% thiobarbituric acid 수용액을 첨가한 후 증류수로 총부피를 4ml 되게 만들어 95℃ shaking waterbath에서 60분간 가온한 뒤 즉시 얼음에 옮겨 식힌 다음 1ml의 증류수와 5ml의 n-butanol : pyridine(15 : 1, V/V) 혼합액을 첨가하여 vortex mixer로 강하게 진탕한 후에 800g(Hettich Universal 2S)에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

3) 혈청, 간조직 및 간세포 분획내 carbonyl group 함량측정 : 혈청과 간균질액 및 간세포 분획내 carbonyl group 함량측정은 Levine 등³⁸의 방법에 의하여 측정하였다. 우선 일정량의 시료(mg protein에 해당하는 량)를 eppendorf tube에 취하여 50µl의 10% streptomycin sulfate를 가한 후에 5분간 얼음속에 놓아둔 뒤 100g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 분취하여 동일부피의 20% tri-

chloroacetic acid(TCA)를 가하고 진탕(Vortex-Genie 2)한 후 500g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질에 0.5ml 10mM 2,4-dinitrophenylhydrazine(in 2N HCl)을 첨가하여 37℃ shaking incubator에서 1시간동안 진탕배양한 후, 0.5ml 20% TCA를 첨가하고 500g에서 5분간 원심분리하여 침전된 반응단백질을 분리하였다. 이렇게 회수한 단백질을 0.6ml 6M guanidine hydrochloride (20mM potassium phosphate에 녹인 후 trifluoroacetic acid로 pH 2.3으로 만든 것)을 가하여 37℃ incubator에서 15분간 방치한 후 재용해시켜 10,000g(Hettich Mikro-Rapid)에서 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 368nm에서 흡광도를 측정하여 평균분자흡광계수 21.0 M⁻¹cm⁻¹를 곱하여 carbonyl group의 mole수를 산정하였다.

4) SDS-PAGE를 이용한 혈청, 간조직 및 간세포 분획의 단백질 분석 : 혈청, 간세포 분획에서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용한 단백질변성 확인실험은 Laemmli³⁷와 송 등⁶⁰의 방법을 이용하였다. SDS buffer(glycerol 10ml, 2-mercaptoethanol 5ml, 20% SDS 11.5ml, 1.5M Tris-Hcl 42ml)에 시료를 동량 혼합한 다음 100℃에서 3분간 가열한 후 원심분리하여 SDS-polyacrylamide gel(10% separating gel 및 4% stacking gel)을 이용하여 70V에서 혈청은 1시간, 간세포 분획은 15시간동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 0.1% Coomassie brilliant blue(50% methanol과 10% acetic acid의 혼합액에 용해한 수용액)로 혈청은 1시간, 간세포분획은 2시간동안 단백질을 염색한 후 탈색용액(50% methanol과 10% acetic acid의 1 : 1 혼합액)으로 탈색시켜 각 시료의 구성단백질 상태를 비교분석하였다.

통계처리 : 모든 실험성적은 분산분석을 하여 F검정결과 유의성(5% 이상)이 나타난 것은 평균치를 구하여 완전 임의배치법에 따른 최소유의차(LSD)검정을 실시하였다⁶⁷.

결 과

혈액화학성분의 변화 : Caffeine을 1회 경구투여한 후 시간경과별로 rat 혈액내 일반 혈액화학성분의 변화를 관찰한 결과 혈액내 glucose, urea nitrogen, uric acid 및 creatinine의 함량변화는 Table 1에서 보는 바와 같이 glucose 함량은 대조군이 101.0mg/dl인데 비하여 2시간 경과

Table 1. Effects of caffeine on the concentrations of glucose, urea nitrogen, uric acid and creatinine in serum according to the time lapsed after single administration of caffeine* (mg/dl)

Time lapsed (hour)	Glucose	Urea nitrogen	Uric acid	Creatinine
0	101.0 ^a ± 9.2	24.8 ± 2.6	2.63 ± 0.38	0.88 ± 0.08
2	122.9 ^b ± 5.0	24.7 ± 1.8	2.55 ± 0.59	0.85 ± 0.07
4	143.0 ^c ± 8.0	24.2 ± 2.9	2.68 ± 0.68	0.89 ± 0.09
8	138.0 ^c ± 6.6	25.0 ± 2.3	2.49 ± 0.45	0.86 ± 0.16
24	119.9 ^{a,b} ± 6.6	24.2 ± 2.3	2.57 ± 0.80	0.92 ± 0.04
48	102.4 ^a ± 6.8	23.8 ± 1.6	2.65 ± 0.34	0.92 ± 0.09
72	104.4 ^a ± 7.3	24.1 ± 1.9	2.67 ± 0.81	0.84 ± 0.13

^{a,b,c} Means with different superscripts within groups of the time lapsed are different(p<0.01).

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

Table 2. Effects of caffeine on the concentrations of triglyceride, total cholesterol and HDL-cholesterol in serum according to the time lapsed after single administration of caffeine* (mg/dl)

Time lapsed (hour)	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol
0	66.5 ± 3.8 ^a	62.8 ± 3.2 ^a	46.7 ± 5.8 ^a
2	52.7 ± 6.2 ^b	72.7 ± 6.6 ^{b,c,d}	59.7 ± 5.2 ^b
4	42.4 ± 5.1 ^c	77.4 ± 6.7 ^d	64.2 ± 4.6 ^b
8	38.8 ± 4.8 ^c	73.4 ± 5.7 ^{c,d}	64.7 ± 6.8 ^b
24	61.8 ± 5.4 ^a	66.9 ± 9.4 ^{a,b,c}	51.6 ± 4.2 ^a
48	68.3 ± 6.1 ^a	64.2 ± 4.5 ^{a,b}	46.4 ± 6.2 ^a
72	63.9 ± 4.7 ^a	61.8 ± 1.9 ^a	47.5 ± 6.8 ^a

^{a,b,c,d} Means with different superscripts within groups are different(p<0.01)

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

시부터 122.9mg/dl로 증가되기 시작하여 4시간 경과시에는 143.0mg/dl로 가장 높게 함량이 증가되었다(p<0.01). 그러나 urea nitrogen, uric acid 및 creatinine의 함량은 대조군과 caffeine 투여군 사이에 유의성 있는 함량의 차이를 보이지 않았다.

Caffeine을 1회 경구투여후 시간경과별로 rat의 혈청내 triglyceride, total cholesterol 및 HDL-cholesterol의 함량 변동을 조사한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이, 혈액내 total cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량은 대조군(62.8, 46.7mg/dl)과 비교해보면 caffeine 투여 4시간에서 8시간 경과시 가장 높은 함량(77.4, 64.7mg/dl)의 증가를 보였다가 점차 시간이 경과함에 따라 함량이 감소되었다(p<0.01). 반면에 중성지방인 triglyceride 함량은 대조군(66.5mg/dl)에 비하여 4시간과 8시간 경과시에 42.4, 38.8mg/dl로 가장 낮은 함량을 보였다가 점차 시간이 경과됨에 따라 회복되었다(p<0.01).

한편 Table 3에서 보는 바와 같이 혈청내 total protein, albumin, globulin 함량 및 A/G 비율을 조사한 결과, 단백질 함량은 대조군과 caffeine 투여군 사이에 유의성 있는 함량의 변화를 보이지 않았다.

그리고 혈청내 AST(GOT), ALT(GPT) 및 ALP의 효소 활성치는 Table 4에서와 같이, AST가 대조군(112U/L)에 비해 caffeine 투여 2시간 경과시 부터 활성도가 증가(149U/L)되기 시작하여 4시간째에는 167U/L까지 증가되었으며, 8시간 경과시에 가장 높은 효소 활성치(178U/L)를 보였다가 점차로 감소되었다(p<0.05). 한편 ALT의 활성치는 대조군(39.7U/L)과 비교할 때 caffeine 투여 24시간째에 가장 높은 활성치(49.3U/L)를 보였으나(p<0.01), ALP의 활성도는 대조군과 caffeine 투여군 사이에 유의성 있는 활성도의 차이를 보이지 않았다.

혈액내 유리지방산, 인지질, carbonyl group 및 malondialdehyde 함량의 변화 : Caffeine을 1회 경구투

Table 3. Effects of caffeine on the concentrations of total protein, albumin, globulin and A/G ratio in serum according to the time lapsed after single administration of caffeine* (g/dl)

Time lapsed (hour)	Total protein	Albumin	Globulin	A/G ratio(%)
0	8.2 ± 0.7	3.9 ± 0.3	4.3 ± 0.8	0.93 ± 0.20
2	7.9 ± 0.5	3.7 ± 0.3	4.3 ± 0.4	0.87 ± 0.10
4	7.6 ± 0.3	3.7 ± 0.2	3.9 ± 0.1	0.95 ± 0.06
8	8.1 ± 0.6	3.9 ± 0.1	4.2 ± 0.6	0.96 ± 0.11
24	7.7 ± 0.8	3.7 ± 0.5	4.0 ± 0.4	0.93 ± 0.11
48	7.8 ± 0.7	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.4	0.89 ± 0.11
72	8.0 ± 0.5	3.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2	0.96 ± 0.04

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

Table 4. Effects of caffeine on the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT) and alkaline phosphatase(ALP) in serum according to the time lapsed after single administration of caffeine* (U/L)

Time lapsed (hour)	Aspartate aminotransferase (AST, GOT)	Alanine aminotransferase (ALT, GPT)	Alkaline phosphatase (ALP)
0	112 ± 18.5 ^A	39.7 ± 6.5 ^a	53.0 ± 16.3
2	149 ± 24.6 ^{A,B}	35.5 ± 2.5 ^b	54.5 ± 17.9
4	167 ± 16.4 ^B	45.5 ± 14.5 ^c	30.5 ± 19.3
8	178 ± 50.6 ^B	38.0 ± 2.2 ^a	49.5 ± 21.7
24	143 ± 18.2 ^{A,B}	49.3 ± 12.7 ^d	47.0 ± 12.3
48	134 ± 34.8 ^{A,B,C}	46.8 ± 4.8 ^c	43.7 ± 20.9
72	98 ± 34.6 ^{A,C}	42.3 ± 10.9 ^e	41.0 ± 20.8

^{A,B,C} Means with different superscripts within groups are different(p<0.05).

^{a,b,c,d,e} Means with different superscripts within groups are different(p<0.01)

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

Table 5. Effects of caffeine on the concentrations of free fatty acid, phospholipid, carbonyl group and malondialdehyde in serum according to the time lapsed after single administration of caffeine*

Time lapsed (hour)	Free fatty acid(mg/dl)	Phospholipid(mg/dl)	Carbonyl group (nmol/mg protein)	Malondialdehyde (nmol/mg protein)
0	37.6 ^a ± 5.9	134.2 ± 15.7	1.65 ± 0.06	0.36 ± 0.04
2	52.1 ^b ± 4.1	138.4 ± 14.9	1.65 ± 0.08	0.34 ± 0.04
4	62.4 ^c ± 4.1	139.0 ± 11.8	1.67 ± 0.11	0.37 ± 0.02
8	65.0 ^c ± 4.1	141.7 ± 12.3	1.73 ± 0.05	0.36 ± 0.02
24	39.1 ^a ± 3.6	133.1 ± 11.6	1.64 ± 0.08	0.35 ± 0.03
48	38.0 ^a ± 4.4	136.0 ± 16.3	1.67 ± 0.06	0.34 ± 0.04
72	38.3 ^a ± 4.6	131.6 ± 13.7	1.62 ± 0.07	0.37 ± 0.03

^{a,b,c} Means with different superscripts within groups are different(p<0.01)

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

Table 6. Effects of caffeine on the concentrations of carbonyl group in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of pooled liver according to the time lapsed after single administration of caffeine* (nmol/mg protein)

Time lapsed (hour)	Total homogenate	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction
0	1.15 ± 0.06	0.66 ± 0.05	1.27 ± 0.08
2	1.07 ± 0.07	0.66 ± 0.07	1.25 ± 0.07
4	1.04 ± 0.08	0.67 ± 0.06	1.18 ± 0.09
8	1.10 ± 0.06	0.69 ± 0.07	1.16 ± 0.07
24	1.09 ± 0.07	0.65 ± 0.07	1.20 ± 0.01
48	1.05 ± 0.06	0.66 ± 0.04	1.24 ± 0.04
72	1.15 ± 0.05	0.68 ± 0.04	1.25 ± 0.05

The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3-5 tests.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

Table 7. Effects of caffeine on the concentrations of malondialdehyde in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of pooled liver according to the time lapsed after single administration of caffeine* (nmol/mg protein)

Time lapsed (hour)	Total homogenate	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction
0	4.52 ± 0.28	2.34 ± 0.05	1.12 ± 0.04
2	4.12 ± 0.21	2.32 ± 0.16	1.04 ± 0.08
4	4.34 ± 0.25	2.31 ± 0.15	1.20 ± 0.02
8	4.82 ± 0.30	2.54 ± 0.09	1.20 ± 0.06
24	4.07 ± 0.15	2.53 ± 0.09	1.19 ± 0.04
48	4.16 ± 0.38	2.54 ± 0.06	1.19 ± 0.02
72	4.32 ± 0.32	2.53 ± 0.13	1.14 ± 0.07

The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3-5 tests.

*: Caffeine was orally administrated with the dose of 100mg per body weight(kg) singly.

여한 급성실험군의 혈청내 유리지방산, 인지질, carbonyl group 및 malondialdehyde 함량은 Table 5에서 보는 바와 같이, 유리지방산의 함량은 대조군(37.6mg/dl)과 비교해볼 때 caffeine 투여 8시간 경과시 함량(65.0mg/dl)이 가장 증가하였으며(p<0.01) 그후에는 점차 회복되었다. 그리고 인지질의 함량은 caffeine 투여후 8시간까지 증가 경향은 있었으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 또한 혈청내 carbonyl group과 malondialdehyde 함량은 대조군과 caffeine 투여군 사이에 유의성 있는 함량의 차이를 보이지 않았다.

간조직내 carbonyl group과 malondialdehyde 함량 변화 : Caffeine을 1회 경구투여후 시간경과별로 간균질액과 mitochondria 및 microsome 분획의 carbonyl group과 malondialdehyde 함량의 변동을 조사해본 결과는 Table 6과 Table 7에서 보는 바와 같이 대조군과 caffeine 투여군 사이에 유의성있는 함량의 차이는 보이지 않았다.

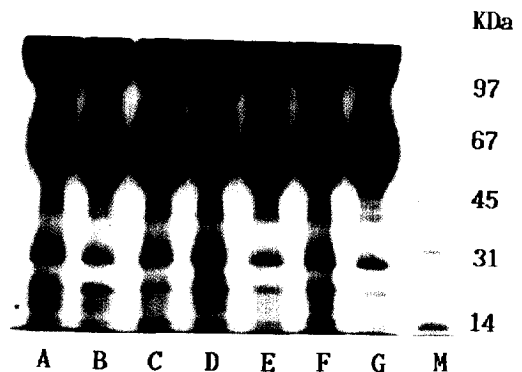


Fig 1. Comparison of the protein profiles in pooled serum. A: control, B: 2hr lapsed, C: 4hr lapsed, D: 8hr lapsed, E: 24hr lapsed, F: 48hr lapsed, G: 72hr lapsed, M: Standard molecular weight mark.

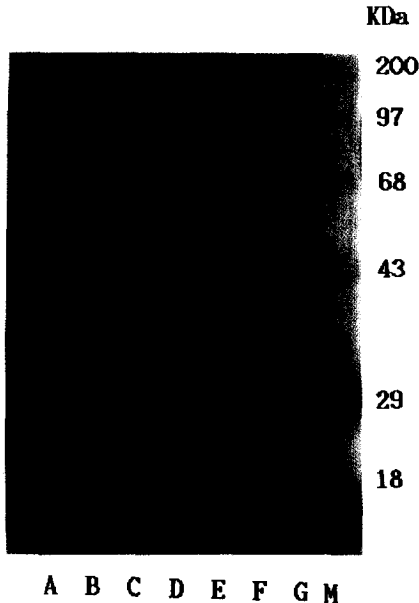


Fig 2. Comparison of the protein profiles in mitochondrial fraction of pooled liver.

A: control, B: 2hr lapsed, C: 4hr lapsed, D: 8hr lapsed, E: 24hr lapsed, F: 48hr lapsed, G: 72hr lapsed, M: Standard molecular weight mark.

SDS-PAGE를 이용하여 rat의 혈청 및 간조직과 간세포 분획의 단백질 분석: Caffeine을 1회 경구투여후 시간경과별로 혈청단백질과 간조직의 mitochondria와 microsome 분획 단백질의 전기영동 형태를 조사해본 결과는 Fig 1, Fig 2 및 Fig 3에서 보는 바와 같이 대조군과 커다란 차이점을 발견할 수 없었다.

고 찰

화학적으로 caffeine은 theophylline, theobromine 등과 함께 purine 유도체의 methylated xanthine으로서 동물의 소화장에서 쉽게 흡수되어 oxidation, demethylation의 대사과정을 거쳐 주요 metabolite인 1-methylxanthine, 1-methyluric acid, 1,7-dimethylxanthine, 7-methylxanthine, 1,3-dimethyluric acid와 unchanged caffeine으로 오줌을 거쳐 배설되게 된다^{25,27}. Caffeine은 강력한 중추신경계 흥분제로서 뇌의 운동신경 중추에 작용하여 조건반사와 근육활동을 항진시킴으로써 피로감을 줄여주고 호흡 및 미주신경 중추를 자극하며 과량섭취시 strychnine convulsion과 유사한 경련을

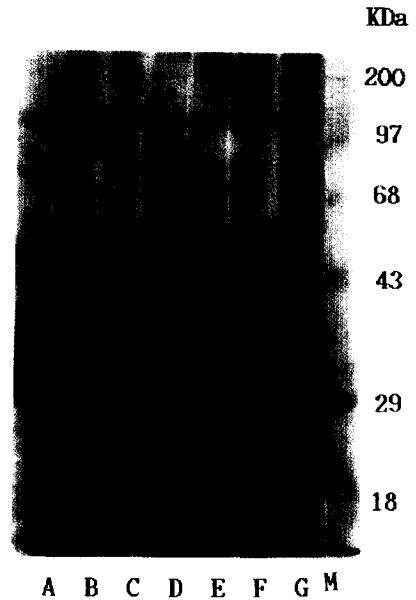


Fig 3. Comparison of the protein profiles in microsomal fraction of pooled liver.

A: control, B: 2hr lapsed, C: 4hr lapsed, D: 8hr lapsed, E: 24hr lapsed, F: 48hr lapsed, G: 72hr lapsed, M: Standard molecular weight mark.

유발하며^{3,14,31,40}, 신세뇨관에서 혈행의 증가와 수분흡수의 감소로 이뇨작용을 촉진시키는 등^{10,26,53,63,64}의 다양한 약리작용을 함과 아울러 theophylline(1,3-dimethylxanthine)과 caffeine은 강력한 bronchodilator로서 asthma와 neonatal apnoea의 치료제로도 사용된다³¹.

또한 caffeine은 비노기, 신장, 췌장의 cancer와 teratogenic agent로도 작용하며 coronary heart disease, myocardial infarction, arteriosclerosis의 원인물질로 작용한다는 많은 보고^{27,32,62}가 있으며, 임신중의 모체와 태아의 장기발생에 형태학적으로 영향을 미치는 물질로도 알려져 있다^{5,28,47,59}.

동물체내에서 탄수화물과 지질대사에 영향을 미치는 caffeine을 실험동물인 Sprague-Dawley rat(female)에 단독투여시 혈액내 일반화학성분과 지질 및 단백질의 과산화물인 malondialdehyde와 carbonyl group의 함량을 분석하고, SDS-PAGE를 이용하여 혈청과 mitochondria 및 microsome 분획의 단백질 구조상의 변화를 관찰함으로써 caffeine이 지질 및 단백질 구성성분에 미치는 영향을 확인하기 위하여 본 실험을 수행하게 되었다.

혈액성분중 glucose 함량을 분석한 결과(Table 1), caffeine을 1회 경구투여후 시간경과별로 glucose의 함량변화는 2시간 경과시부터 증가하기 시작하여 4시간 경과시에 가장 높게 나타났다($p < 0.01$). 그러나 urea nitrogen, uric acid, creatinine의 함량에는 유의성 있는 함량의 변화가 없었다. 이렇게 caffeine이 투여된 군에서 혈당이 증가하는 것은 Cheraskin 등^{12,13}이 사람에게 caffeine을 투여하니 혈당이 2시간 경과시부터 상승하였으며, Oberman 등⁴⁶이 mouse에 caffeine을 1회 투여하니 혈당상승이 180분 이상 계속 지속하였다는 보고와 유사한 경향을 보였는데, 이는 체내에 투여된 caffeine이 phosphorylase b를 phosphorylase a로 활성화시켜 glycogen으로부터 glucose 유리를 촉진시킨다는 보고^{4,22,34,36,46,61}에서와 같이 caffeine 투여로 인해 cAMP phosphodiesterase 활성이 억제되어 cAMP가 5'AMP로 분해되지 못하여 cAMP가 축적된 결과 때문으로 생각된다.

혈청내 total cholesterol과 HDL-cholesterol 함량(Table 2)은 caffeine 투여 2시간 후부터 8시간 사이에 가장 높았으며($p < 0.01$). 중성지방인 triglyceride 함량은 반대로 caffeine에 의해 함량이 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$). 이는 Akinyanju 등²이 rat에 50일동안 coffee가 함유된 사료를 급여했을 때 cholesterol이 대조군에 비하여 높은 함량의 증가를 나타내었다는 보고와, Naismith 등⁴⁵이 rat에 coffee를 첨가한 사료를 급여했을 때 caffeine 투여용량이 높을수록 혈청내 cholesterol 농도가 월등히 증가했다는 보고와 본 실험에서 caffeine이 투여된 군의 cholesterol 함량증가의 결과가 일치하였다.

이렇게 caffeine이 투여된 군에서 혈청내 cholesterol 함량이 증가하는 것은 caffeine에 의해 혈중에 유리된 free fatty acid가 acetyl-CoA로 대사되어 cholesterol의 주 근원 물질인 mevalonate로 합성⁴³되었기 때문에 cholesterol의 함량이 증가한 것으로 생각되며, 실제로 핵을 가진 모든 동물조직 특히 liver, adrenal cortex, skin, intestine, testis 및 aorta에서 cholesterol을 합성할 수가 있으며 세포내 microsome과 cytosol 분획에서 cholesterol 합성이 주로 일어나게 된다. 이렇게 형성된 과잉의 cholesterol은 혈액내 lipoprotein과 결합하여 퇴행성 질환인 동맥경화증(arteriosclerosis)과 관상동맥성 심장병(coronary heart disease) 등을 유발한다는 보고가 있다^{43,65}.

한편 중성지방인 triglyceride 함량은 caffeine이 투여된 군에서 유의성 있는 함량의 감소를 보였는데($p < 0.01$), 이

는 Akinyanju 등²이 rat에게 50일동안 coffee 함유사료를 급여하니 triglyceride 함량이 감소하였다는 보고와, Naismith 등⁴⁵이 rat에 coffee 함유사료를 54일동안 급여시 혈중 triglyceride 함량이 유의성 있게 감소했다는 보고와 일치하였는데, 이는 체내에 투여된 caffeine에 의해서 adipose tissue내에 cAMP가 축적됨으로써 저장지방 조직내의 triglyceride로부터 lipolysis가 촉진된 결과로 사료된다.

혈청단백질의 함량(Table 3)은 대조군과 비교할 때 유의성 있는 차이점을 발견할 수 없었으며, 혈청내 AST (aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase)의 효소활성도를 분석한 결과(Table 4) AST가 caffeine 투여후 2, 4, 8, 24, 48시간 경과시에 효소의 활성도가 증가되었으며($p < 0.05$), ALP는 실험군에서 유의성 있는 활성도의 차이를 보이지 않았다. 그러나 ALT는 caffeine 1회 투여 후 4, 24, 48, 72시간 경과시에는 활성도가 증가되었다($p < 0.01$). 이와같이 AST와 ALT가 caffeine 투여 후 활성도가 증가한 것은 간에 영향을 미치는 일종의 약물과 마찬가지로 간에서 caffeine이 일시적으로 효소활성도에 영향을 미치지만 저수준의 caffeine 투여시에는 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있는데 이는 아직까지 AST와 ALT 활성도에 영향을 미치는 약제의 정확한 기전이 밝혀져 있지 않고 운동량이 증가함에 따라 AST와 ALT의 활성치가 증가한다는 보고⁶⁶와, 체내 투여된 caffeine이 간에서 methylation과 demethylation 등의 분해대사되는 과정^{25,57} 과 투여된 caffeine으로 인하여 중추신경계가 자극을 받아 운동량이 증가함에^{3,14,31,40} 따른 것 때문으로 사료된다.

혈청내 유리지방산의 함량(Table 5)은 대조군에 비해 caffeine이 투여된 후 8시간까지 함량이 증가하였으며($p < 0.01$), 인지질의 함량도 caffeine 투여 후 증가경향을 보였으나 유의성 있는 함량의 차이는 보이지 않았다. 이외에 단백질의 손상여부를 확인하기 위하여 carbonyl group을 비교분석해본 결과 대조군과 유의성 있는 차이점이 없었으며 지질과산화물인 malondialdehyde 함량도 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다. 이와같이 혈청내 유리지방산의 함량증가는 Bellet 등^{7,8}이 사람에게 caffeine을 1회 투여하니 혈청내 유리지방산 함량이 투여후 60분부터 180분까지 유의성 있게 증가하였고, Patwardhan 등⁵⁰이 사람에게 caffeine 250mg을 1회 경구투여한 결과, 투여후 4시간까지 혈장 유리지방산의 함량이 증가

하였다는 보고, Feinberg 등¹⁹이 사람에게 coffee를 섭취시키니 혈청내 유리지방산의 함량이 투여후 3시간 경과시에 유의성 있게 증가했다는 보고와 유사한 결과를 보였다. 이렇게 혈청내 유리지방산의 함량이 caffeine 투여군에서 증가하는 것은 caffeine에 의해 cAMP phosphodiesterase 활성이 억제됨으로써 cAMP로부터 5'AMP로 degradation 되는 것을 차단하여 cAMP가 축적됨으로써 lipolysis가 촉진되어 triglyceride로부터 지방산이 유리되는 것에^{9,42} 기인하는 것으로 사료된다.

그러나 간균질액과 간세포 소기관인 mitochondria와 microsome 분획의 carbonyl group과 malondialdehyde 함량이 caffeine이 미치는 영향을 조사해본 결과(Table 6, Table 7) 유의성 있는 차이점이 인정되지 않았으며, 혈액과 간세포 소기관에서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 단백질 손상여부를 관찰한 결과(Fig 1, 2, 3) 뚜렷한 단백질의 산화적 손상을 관찰할 수 없었는데 이는 caffeine이 지질과 단백질의 산화작용에는 영향을 미치지 않았기 때문으로 사료된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 caffeine은 동물체내 혈액과 간조직 및 간세포 소기관에서 탄수화물과 지질 구성성분에 많은 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었으며 특히 caffeine 투여로 인하여 혈액내 glucose, cholesterol, free fatty acid의 함량을 상승시키고 triglyceride 함량을 감소시키며, caffeine 자체는 혈액과 간조직 및 간세포 소기관내 malondialdehyde와 carbonyl group 함량에는 영향을 미치지 않았으며, SDS-PAGE를 통해 단백질 구성성분의 손상을 조사한 결과 동물체내 단백질 구성성분에는 caffeine이 직접적인 영향을 미치지 않고 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

Caffeine(100mg/kg body weight)을 Sprague-Dawley rat (female)에 1회 경구투여한 후 2, 4, 8, 24, 48, 72시간 경과시의 혈액과 간조직내에서의 지질과 단백질 구성성분에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 혈액내 glucose, urea nitrogen, uric acid, creatinine, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, total protein 및 albumin 함량과 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)와 alkaline phosphatase(ALP)효소의 활성치를 측정하고, 혈액내 free fatty acid와 phospholipid 함량을 비교 분석함과 아

울러 혈액과 간조직 및 간세포 소기관내의 carbonyl group과 malondialdehyde 함량을 분석하였다. 그리고 혈액과 간세포 소기관 및 배양세포주의 구성단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 조사하여 단백질의 산화적 손상여부를 확인하였다.

1. 혈액내 glucose 함량은 대조군(101.1mg/dl)에 비하여 caffeine 투여 4시간에서 8시간 경과시에 143.0mg/dl, 138.0mg/dl로 높게 나타났으며($p < 0.01$), urea nitrogen, uric acid, creatinine 함량에는 변화가 없었다.

2. 혈액내 total cholesterol과 HDL-cholesterol 함량은 caffeine 투여후 4시간과 8시간째 대조군(62.8mg/dl, 46.7mg/dl)에 비하여 77.4mg/dl, 64.7mg/dl로 증가했으며($p < 0.01$), triglyceride 함량은 대조군(66.5mg/dl)에 비하여 caffeine 투여 8시간째 38.8mg/dl로 가장 낮게 나타났다($p < 0.01$). 그러나 혈청내 total protein과 albumin 함량 및 A/G ratio에는 변화를 관찰할 수 없었다.

3. 혈청내 AST 활성도는 대조군(112U/L)에 비하여 caffeine 투여 2시간 후부터 149U/L로 활성도가 증가하여 8시간 경과시 178U/L로 가장 높게 나타났으며($p < 0.05$), ALT의 활성도는 대조군(39.7U/L)에 비하여 4(45.5U/L), 24(49.3U/L), 48(46.8U/L), 72(42.3U/L)시간 경과시에 활성도가 증가하였으며($p < 0.01$), ALP의 활성도에는 변화가 없었다.

4. 혈청내 유리지방산의 함량은 대조군(37.6mg/dl)에 비하여 caffeine 투여후 8시간 경과시에 65.0mg/dl로 높게 나타났으며($p < 0.01$), 인지질의 함량은 시간이 경과함에 따라 증가경향을 보였다. 아울러 혈액과 간균질액, mitochondria, microsome 분획내 carbonyl group과 malondialdehyde 함량에는 차이가 없었다.

5. SDS-PAGE를 통해 혈액과 간세포 소기관 단백질의 산화적 손상여부를 관찰한 결과 뚜렷한 단백질의 산화적 손상을 관찰할 수 없었다.

참 고 문 헌

1. Acheson KJ, Markiewicz BZ, Anantharaman K, et al. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *Am J Clin Nutr*, 33:989-997, 1980.
2. Akinyanju P, Yudkin J. Effect of coffee and tea on serum lipids in the rat. *Nature*, 214:426-427, 1967.

3. Alexander F. An introduction to veterinary pharmacology. 3rd ed. London, Churchill livingstone, 144-147, 1976.
4. Anderson J, Hollifield GH, Owen JA. The effect of caffeine, deoxyribose nucleic acid and insulin on the metabolism of glucose by adipose tissue *in vitro*. *Metabolism*, 15:30-38, 1966.
5. Banner W, Czajka PA. Acute caffeine overdose in the neonate. *Am J Dis Child*, 134:495-498, 1980.
6. Bellet S, Feinberg LJ, Sandberg H, *et al*. The effect of caffeine on free fatty acids and blood coagulation parameters of dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 159:250-254, 1968.
7. Bellet S, Kershbaum A, Aspe J. The effect of free fatty acids. *Arch Intern Med*, 116:750-752, 1965.
8. Bellet S, Kershbaum A, Finck EM. Response of free fatty acids to coffee and caffeine. *Metabolism*, 17:702-707, 1968.
9. Blecher MB, Merlino NS, Ro'Ane JT. Control of the metabolism and lipolytic effects of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methyl xanthines, and nicotinic acid. *J B C*, 243:3973-3977, 1968.
10. Boyd EM. The acute oral toxicity in guinea pigs of acetylsalicylic acid, phenacetin, and caffeine, alone and combined. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2:23-32, 1960.
11. Carlson LA, Butcher RW, Micheli H. Fat mobilizing lipolysis and levels of cyclic AMP in human and dog adipose tissue. *Acta Med Scand*, 187:525-528, 1970.
12. Cheraskin E, Ringsdorf WM, Barrett RA. Effect of caffeine versus placebo supplementation on blood-glucose concentration. *Lancet*, 1:1299-1300, 1967.
13. Cheraskin E, Ringsdorf WM. Blood-glucose levels after caffeine. *Lancet*, 2:689, 1968.
14. Clark WG, Craig brater D, Johnson AR. Goth's medical pharmacology. St. Louis, The C V Mosby Company, 302-307, 1988.
15. Clozel M, Branchaud CL, Tannenbaum GS, *et al*. Effect of caffeine on thyroid and pituitary function in newborn rats. *Pediatr Res*, 17:592-595, 1983.
16. Colton T, Gosselin RE, Smith RP. The tolerance of coffee drinkers to caffeine. *Clin Pharmacol Ther*, 9:31-39, 1968.
17. Danellis JV, Harris CG. The effect of *in vitro* and *in vivo* caffeine, theophylline, and hydrocortisone on the phosphodiesterase activity of the pituitary, median eminence, heart, and cerebral cortex of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 128:1016-1021, 1968.
18. DeCastro O, Sandberg H, Feinberg LJ, *et al*. Effects of various routes of caffeine administration on oral and intravenous glucose tolerance tests in dogs. *Metabolism*, 18:163-171, 1969.
19. Feinberg LJ, Sandberg H, DeCastro O, *et al*. Effects of coffee injection on oral glucose tolerance curves in normal human subjects. *Metabolism*, 17:916-922, 1968.
20. Gidez LI, Roheim PS, Eder HA. Effect of plasma free fatty acid concentrations on triglyceride synthesis by the perfused liver. *Fed Proc*, 21:289, 1962.
21. Gilbert NC, Dey F, Trump R. The effect of the methylated xanthines on the clotting time of the blood. *J Lab Clin Med*, 32:28-33, 1947.
22. Gilboe DP, Nuttall FQ. Stimulation of liver glycogen particle synthase D phosphatase activity by caffeine, AMP, and glucose 6-phosphate. *Arch Biol Biophys*, 219:179-185, 1982.
23. Gilboe DP. The mechanism of caffeine-enhanced glucose stimulation of liver glycogen synthase phosphatase activity. *Biochem Pharmacol*, 35:2097-2105, 1986.
24. Hanahan DJ, Dittmer, JC, Waraschina EA. A column chromatographic separation of classes of phospholipids, *JBC*, 226:685-700, 1957.
25. Hartley R, Smith LJ, Cookman JR. Improved HPLC method for the simultaneous determination of caffeine and its N-demethylated metabolites in plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogram*, 342:105-117, 1985.
26. Heaney RP, Recker RR. Dietary caffeine and calcium excretion. *Nutritional Review*, 46:232-234, 1988.
27. Heyden S, DeMaria W, Johnston WW, *et al*. Caffeine effects on cholesterol and development of aortic and coronary atherosclerosis in rabbits. *J Chron Dis*, 21:

- 677-685, 1969.
28. Hoff W. Caffeine in pregnancy. *The Lancet*, 1:1(8279): 1020, 1982.
 29. Hogeboom GH. In methods in enzymology. Vol 1. New York, *Academic Press*, 16-19, 1955.
 30. Hooser SB, Beasley VR. Current veterinary therapy-methylxanthine poisoning(chocolate and caffeine toxicosis). Philadelphia, WB Saunders Co, 191-192, 1986.
 31. James EF. The extra pharmacopoeia. 29th ed. London, The pharmaceutical press, 1521-1524, 1989.
 32. Johansson S. Cardiovascular lesions in sprague-dawley rats induced by long-term treatment with caffeine. *Acta Path Microbiol Scand Sect A*, 89:185-191, 1981.
 33. Jorda A, Portoles M, Guasch R, *et al*. Effect of caffeine on urea biosynthesis and some related processes, ketone bodies, ATP and liver amino acids. *Biochem Pharmacol*, 38:2727-2732, 1989.
 34. Kasvinsky PJ, Fletterick RJ, Madsen NB. Regulation of the dephosphorylation of glycogen phosphorylase a and synthase b by glucose and caffeine in isolated hepatocytes. *Can J Biochem*, 59:387-395, 1981.
 35. Kasvinsky PJ, Schechosky S, Fletterick RJ. Synergistic regulation of phosphorylase a by glucose and caffeine. *JBC*, 253:9102-9106, 1978.
 36. Kufnec DM, Mayer J. Extreme sensitivity obese hyperglycemic mice to caffeine and coffee. *Metabolism*, 13:1369-1375, 1964.
 37. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 27: 680-685, 1970.
 38. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al*. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol*, 186:464-478, 1990.
 39. Lillemo KD, Magnuson TH, High RC, *et al*. Caffeine prevents cholesterol gallstone formation. *Surgery*, 106: 400-407, 1989.
 40. Lopes JM, Aubier M, Jardim J, *et al*. Effect of caffeine on skeletal muscle function before and after fatigue. *J Appl Physiol*, 54:1303-1305, 1983.
 41. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 174-180, 1983.
 42. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 232-236, 1983.
 43. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 1983; 249-256.
 44. Mitchell MC, Hoyumpa AM, Schenker S, *et al*. Inhibition of caffeine elimination by short-term ethanol administration. *J Lab Clin Med*, 101:826-834, 1983.
 45. Naismith DJ, Akinyanju PA, Yudkin J. Influence of caffeine-containing beverages on the growth, food utilization and plasma lipids of the rat. *J Nutr*, 97:375-381, 1969.
 46. Nehlig A, Daval JL, Boyet S, *et al*. Comparative effects of acute and chronic administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Europ J Pharmacol*, 129:93-103, 1986.
 47. Nishimura H, Nakai K. Congenital malformations in offspring of mice treated with caffeine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 104:140-142, 1960.
 48. Oberman Z, Harell A, Herzberg M, *et al*. Changes in plasma cortisol, glucose and free fatty acids after caffeine ingestion in obese women. *Isr J Med Sci*, 11:33-36, 1975.
 49. Okawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358, 1978.
 50. Patwardhan RV, Desmond PV, Johanson RF, *et al*. Effect of caffeine on plasma free fatty acids, urinary catecholamines, and drug binding. *Clin Pharmacol Ther*, 28:398-403, 1980.
 51. Peter JM, Boyd EM. The influence of sex and age in albino rats given a daily oral dose of caffeine at a high dose level. *Canad J Physiol Pharmacol*, 45:305-311, 1967.
 52. Renner E, Wietholtz H, Huguenin P, *et al*. Caffeine: A model compound for measuring liver function. *Hepatology*, 4:38-46, 1984.
 53. Ruby DR, Lee S. Coffee and hypokalemia. *J Fam Pract*, 26:679-680, 1988.
 54. Scherf D, Schlachman M. The effect of methyl xanthines on the prothrombin time and the coagulation of the blood. *Amer J Med Sci*, 212:83-89, 1946.

55. Schlosberg AJ. Acute and chronic effects of caffeine on brain monoamine levels and endocrine function in the rat. *Arch Int Pharmacodyn*, 267:149-160, 1984.
56. Schlosberg AJ, Fernstrom JD, Kopczynski MC, *et al*. Acute effect of caffeine injection on neutral amino acids and brain monoamine levels in rats. *Life Science*, 29:173-183, 1981.
57. Scott NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of the urinary metabolites of caffeine and theophylline by HPLC. *J Chromatogram*, 375:321-329, 1986.
58. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fraction *in vitro*. *Biochem J*, 123:805-814, 1971.
59. Smith SE, McElhatton PR, Sullivan FM. Effects of administering caffeine to pregnant rats either as a single daily dose or as divided doses four times a day. *Food Chem Toxicol*, 25:125-133, 1987.
60. Song CS, Lee TC. Effect of chemical inactivants on viral polypeptide of newcastle disease virus. *Res Rept RDA(V)*, 30:77-89, 1988.
61. Steinfelder HJ, Petho-Schramm S. Methylxanthines inhibit glucose transport in rat adipocytes by two independent mechanism. *Biochem Pharmacol*, 40:1154-1157, 1990.
62. Takayama S, Kuwabara N. Long-term study on the effect of caffeine in wister rats. *Gann*, 73:365-371, 1982.
63. Whiting SJ, Whitney HL. Effect of dietary caffeine and theophylline on urinary calcium in the rat. *J Nutr*, 117:1224-1228, 1987.
64. Yeh JK, Aloia JF, Semla HM, *et al*. Influence of injected caffeine on the metabolism of calcium and the retention and excretion of sodium, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and copper in rats. *J Nutr*, 116:273-280, 1986.
65. 김세권. 생화학. 서울, 청문각, 1993; 149-172.
66. 이귀령, 김진규. 임상화학. 서울, 의학문화사, 301-309, 1988.
67. 조재영, 장권열. 실험통계분석법. 10판. 서울, 향문사, 104-106, 1986.
68. 허린수, 김성훈, 모기철, 박항균. 혈청 및 적혈구 막내 인지질의 직접 비색 정량방법. *경북대농학지*, 2: 73-79, 1984.
69. 허린수, 김영홍, 도재철, 최연식. 탈지사료 및 철분 투여가 Rat에 있어서 지질과산화에 미치는 영향. *한국노화학회지*, 1:92-97, 1991.