

유자차가 랫드 간암화과정에서 태반형 Glutathione S-transferase(GST-P) 양성 병소에 미치는 영향

김형숙 · 김희선* · 신길상** · 최 혜미

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과
*순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과
**순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

Suppressive Effects of Citron Tea on Induction of Placental Glutathione S-transferase(GST-P) Positive Foci

Kim Hyung Sook , Kim Hee Seon* , Shin Kil-Sang** and Choi Hay mie

Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Korea
*Department of Food Science and Nutrition, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Korea

**Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Korea
(Received November 12, 1997)
(Accepted November 30, 1997)

ABSTRACT : The influences of dietary supplement of citron tea on the hepatocellular chemical carcinogenesis have been studied by examining placental glutathione S-transferase(GST-P) positive foci area in a liver tissue, contents of total cytochrome P450, thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) and glucose 6-phosphatase(G6Pase) in hepatic microsome and glutathione S-transferase(GST) activity. Weaning Sprague-Dawley male rats were fed AIN76 diet with or without citron tea supplement. Rats of CTR and CTR+ groups were fed diet without citron tea supplement while CDI and CDI+ groups were fed diet with citron tea supplement for the entire experimental period(13 weeks). Rats of CDP and CDP+ groups were fed diet without citron tea supplement for the first 7 weeks and switched to citron tea containing diet for the last 6 weeks of experimental period. CTR+, CDI+ and CDP+ groups were carcinogen treated group. Diethylnitrosamine(DEN) was used as a carcinogen initiator and injected to the rats of carcinogen treated groups as a single dose of 200 mg/kg body weight intraperitoneally after 4 weeks of feeding. 2-Acetylaminofluorene(AAF) was used as a carcinogen promoter and supplied in the diets of carcinogen treated rats as 0.02% content for the last 6 weeks starting from 2 weeks after DEN injection. Rats were sacrificed after 13 weeks of feeding. Liver/body weight ratio and GST activities were increased by carcinogen treatment. However, they were not changed by citron tea supplement. Total cytochrome P450 contents were not changed by carcinogen treatment or citron tea supplement. TBARS contents of carcinogen treated rats showed tendency to decrease by citron tea supplement. G6Pase activity decreased by carcinogen treatment and citron tea supplement. The area of GST-P positive foci detected in carcinogen treated rats were decreased by citron tea supplement and not affected by the timing and the duration of citron tea supplement. These results suggest that citron tea has suppressive effects on hepatocellular chemical carcinogenesis probably through antioxidant compounds by decreasing TBARS contents.

Key Words : Hepatocellular chemical carcinogenesis, Citron, GST-P positive foci, TBARS, Rats

I. 서 론

역학조사에 의하면 과일과 채소의 섭취는 식도암,

위암, 대장암등의 발생률을 낮출 수 있다고 보고되고 있다(Negri *et al*, 1994). 또한 화학적 발암원을 이용한 실험들을 통해 과일이나 채소에있는 영양소와 phytochemical과 같은 미량영양성분들이 발암과정을 억제 하는 기전이 증명되고 있다(Wargovich, 1997). 미국의

*본 연구의 일부는 순천향대학교 학술조성연구비로 수행되었습니다.

National Cancer Institute(NCI)에서는 암의 위험률을 줄이기 위한 식사지침에서 과일과 채소의 섭취를 권장하고 있다(Butrum *et al*, 1988).

감귤류에 대한 연구에서 비타민 C, flavonoids, d-limonene 등의 항암효과가 보고되고 있다. 비타민 C는 생체내에서 amine과 nitrite가 반응하여 발암성을 가진 nitrosamine이 형성되는 것을 방지함으로써 폐암, 대장암 등을 억제하며, 역학조사에서도 식도암과 위암을 감소시킨다고 보고되었다(Committee on diet, nutrition, and cancer, 1982). 또한 비타민 C의 항산화성도 항암 효과에 기여한다(Burton and Ingold, 1989). 비타민 C는 감귤류의 과육보다 과피부분에 더 많이 존재하며(Kefford and Chandler, 1970), 유자의 경우도 비타민 C가 과피에 과육보다 3배정도가 많다(정지훈, 1974).

감귤류의 flavonoids중 항암성이 증명된 성분은 tangeretin, nobiletin, naringin, hesperidin, quercetin 등이다(Attaway, 1994). Flavonoids가 항암효과를 나타내는 기전으로는 항산화성(Salvayre *et al*, 1988; Das and Ratty, 1986)과 약물대사효소계 변화(Wood *et al*, 1986; Canivenc-Lavier *et al*, 1996; Siess *et al*, 1989)로 생각된다. D-limonene은 과피에 존재하며 유방암을 유도한 실험동물에서 약물대사효소계를 변화시켜 발암물질의 해독을 촉진하여 항암효과를 보였다(Maltzman *et al*, 1991).

그러므로, 감귤류의 일종인 유자에서도 항암효과가 있을 것으로 기대된다. 특히 유자는 차로써 과육과 과피를 함께 섭취할 수 있으므로 과피에 풍부한 비타민 C와 limonene의 손실을 최대한 막을 수 있다. 이제까지의 연구들은 주로 각 성분별로 이루어져 실제 식품으로 섭취할 때의 효과에 대하여 연구할 필요가 있다고 생각한다.

유자의 항암효과로 기대되는 기전은 다음과 같다. 첫째, 비타민 C와 flavonoids의 항산화성으로 지질과산화물을 예방할 수 있다. 발암원이나 외인성 약물 투여는 free radicals 생성을 증가시키고, free radicals에 의해 세포막의 polyunsaturated fatty acids를 기질로 지질과산화 반응이 촉진된다(Horton and Fairhurst, 1987). 생성된 지질과산화물중 대표적인 malondialdehyde는 아민화합물, 인지질의 head group, DNA, RNA등과 결합할 수 있으므로 막의 손상과 DNA에 유전적인 변화를 유발하여 암화과정을 촉진시킬 수 있다(Taple, 1973; Voca, 1989). 그러므로, 항산화성을 가진 비타민 C와 flavonoids는 지질과산화물의 생성을 억제시킴으로써 항암효과를 나타낼 수 있다. 본 연구에서는 지질과산화물인 malondialdehyde 함량을 측정하고, 막 안정도의 지표인 glucose 6-phosphatase 활성도로 막의 손상정도를 측정하였다.

둘째, 약물대사효소계의 변화를 예상할 수 있다. 약

물대사효소계는 1단계와 2단계로 나누어지는데, 1단계 효소는 cytochrome P450(P450) 의존성 mixed function oxidase(MFO) system으로 체내의 발암물질을 친전자성으로 전환시켜 세포의 고분자 물질(DNA, RNA, 단백질)과 결합하거나, 2단계 효소를 통해 체외로 배설시킬 수 있다(Steven and Jeffrey, 1992). 2단계 효소는 1단계 효소에 의해 형성된 활성화된 물질을 UDP-glucuronyltransferase(UGT)나 glutathione S-transferase(GST)의해 glucuronic acid, glutathione과 결합하여 체외로 배설시킨다(Kitahara *et al*, 1984). 비타민 C 결핍시 P450을 비롯한 MFO계 효소활성도가 감소하며, 많은 양을 섭취한 경우에는 증가시킨다고 한다(Ginter, 1989). Flavonoids의한 약물대사효소계의 변화도 보고되고 있다. Tangeretin을 식이에 보충한 경우 P450과 UGT는 증가하였으나 GST는 변화가 없었다(Siess, 1989). 그러나 tangeretin이 GST와 UGT를 증가시키는 경향이 있다고 보고하는 다른 연구도 있다(Canivenc-Lavier *et al*, 1996). 또한 naringenin의 대사체들이 P450A4를 활성화시켰다는 보고도 있다(Guengerich and Kim, 1990). Limonene도 P450(Maltzman *et al*, 1991)과 GST활성도(Hasegawa *et al*, 1994)를 증가시키는 것이 관찰되었다. 그러므로 본 연구에서는 유자차를 식이로 섭취하였을 때 약물대사효소계의 변화를 살펴보기 위해 총 P450함량과 GST 활성도를 측정하였다.

본 연구는 쥐 간세포암화과정에서 유자의 항암효과를 알아보기 위하여 발암개시원으로 diethylnitrosamine(DEN)과 발암촉진제로 2-acetylaminofluorene(AAF)을 사용하여 간세포암을 유도하였다. 유자의 공급원으로 유자차를 식이의 5% 수준으로 사용하였고, 항암효과가 암의 발생단계 즉 개시과정과 촉진과정중 어느 단계에 작용하는지를 알아보기로 개시과정부터 유자차를 공급한 군과 촉진과정부터 유자차를 공급한 군으로 나누어 실험하였다.

간세포암의 전암성 병변의 지표로 GST-P 양성 병소를 측정하였는데, GST-P 양성 병소는 쥐의 정상간에서 거의 발현되지 않고 간세포 암화과정중 전암성 병변에서 현저하게 발현되며, 주변 간세포들의 비특이적 염색이 적어 간세포암화과정의 효과적, 특이적, 안정적 표지자로 이용되고 있다(Tatematsu *et al*, 1988).

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

체중이 80-90 g 정도의 Sprague-Dawley종 웅성랫드

를 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받아 온도, 습도, 채광이 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 1\%$, 7:00-19:00로 조절되는 사육실 환경에 순응시킨후 각 군마다 6마리씩, 6군으로 체중에따라 군별로 비슷한 체중분포를 하도록 나누어 실험식으로 13주간 사육하였다.

2. 실험식이 및 처치

실험식은 AIN-76 diet(Bieri *et al.*, 1977; Bieri, 1980)를 변형하여 Table 1과 같이 제공하였다. 유자차 보충 식이(citron tea diet)중 유자차 고형분에 포함된 당 96.8%와 섬유소 3.2%를 정상 식이(control diet)의 sucrose와 cellulose로 보정하여 주었다.

실험 기간중 제공된 식이와 처치는 Fig. 1과 같다. 발암원 처리군으로 CTR+, CDI+, CDP+군을 설정하고 실험개시 4주후에 발암개시원으로 DEN 200 mg/kg b.w.을 복강주사하고 그 2주후부터 6주간 AAF를 실험식에 0.02% 첨가하여 제공하였고, 대조군으로 CTR, CDI, CDP군을 설정하였다. CTR과 CTR+군은 실험기

간동안 정상 식이를 제공하였고, CDI와 CDI+군은 실험기간동안 유자차 보충 식이를 제공하였다. CDP와 CDP+군은 실험 시작후 6주동안은 정상 식이를 제공하고, 그후 유자차 보충 식이를 제공하였다.

3. 시료의 수집 및 전처리

실험동물은 12시간 절식후 절두방법으로 희생시킨후 즉시 간을 적출하였다. 적출된 간의 무게를 측정후 Tri-HCl buffer(154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA buffer, pH 7.4)로 균질화한 다음, 고속원심분리기에서 4°C 12,000 xg의 조건하에 20분간 원심분리한 후, 그 상층액을 뽑아 초고속 원심분리기에서 4°C 105,000 xg의 조건하에서 1시간 다시 원심분리하여 세포질 분획(상층액)과 소포체 분획(pellet)을 얻었다(Degawa *et al.*, 1989). 세포질 분획과 Tris-HCl buffer로 재부유시킨 소포체 분획을 에펜도르프 튜브에 나누어 담아 액체 질소로 얼린후 -70°C 에서 냉동 보관하였다가 분석에 사용하였다. 간 중 일부는 적당한 크기로 잘라 면역 조직화학적 검사를 위해 냉아세톤에 고정시켰다.

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

Component	Control diet	Citron tea diet
Casein	200	200
Corn oil	50	50
Starch	601.6	601.6
Sucrose	48.4	
Cellulose	50	48.4
Choline bitartrate	2	2
AIN 76 Vit. Mix	10	10
AIN 76 Mineral Mix	35	35
DL-methionine	3	3
Citron tea solids		50

4. 면역 조직화학적 염색

냉아세톤으로 고정시킨 간 조직의 GST-P 양성 증식성 결절을 확인하기위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 하였다(Tatematsu *et al.*, 1988). 냉아세톤에 고정시킨 조직을 xylene으로 투명화(clearing)하고 paraffin으로 포매하여 $8 \mu\text{m}$ 두께로 절편하였다. Xylene으로 paraffin을 녹여내고 농도하강순으로 단계적 알코올 hydration과정을 거쳐 조직을 수화시킨 다음 증류수와 0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 moisture chamber내에서 정상 산양 혈청(1:5 희석; 0.01M PBS pH7.4)으로 처리한다음 과잉의 수분을 제거한후, 1차 항체인 rabbit anti-GST-P antibody(Medical and Biological Laboratories Co. Japan)를 0.01M PBS에 1:2500으로 희석하여 반응시켰고, H_2O_2 -methanol 혼합액을 처리하여 내재성 과산화수소의 활성을 제거하고 0.01M PBS로 세척하였다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG와 avidin-biotin-peroxidase complex(Vectastain Elite ABC kit, Vecta Laboratories, Inc. USA)를 순서대로 moisture chamber에서 반응시켰고 diaminobezidine(Sigma, USA)용액(0.02% w/v, 0.2M Tris buffer, pH 7.6)과 H_2O_2 를 첨가하여 정색반응을 일으킨다음 Harrie's hematoxylin(영동제약)으

Group 0 2 4 6 8 10 12 13wk

CTR			△									
CTR+			▲									
CDI			△									
CDI+			▲									
CDP			△									
CDP+			▲									

Fig. 1. Experimental design.

△ 2.0 ml saline/kg BW as control
 ▲ 200 mg DEN in 2.0 ml saline/kg BW i.p. injection
 □ Control diet
 III 0.02% AAF in diet
 = 5% citron tea in diet
 ▨ 0.02% AAF in diet+5% citron tea in diet
 CTR: Control diet
 CTR+: Carcinogen treatment
 CDI: Citron tea diet from initiation
 CDI+: Carcinogen treatment with citron tea diet from initiation
 CDP: Citron tea diet from promotion
 CDP+: Carcinogen treatment with citron tea diet from promotion

로 대조염색 하였다. GST-P 양성 증식성 결절의 수와 면적은 칼라 화상 분석기(Program : BMI Plus, 현미경 : Nikon SMZ-10, Camera : SAC-410ND)를 이용하여 측정 하였다.

5. 생화학적 검사

간 소포체분획에서 cytochrome P450함량은 Omura와 Sato(1964)방법, TBARS 함량은 Buege와 Aust(1983)방법과 G6Pase 활성도는 Baginski 등(1983)방법을 이용하여 측정하였고, 세포질 분획에서 GST 활성도를 Habig 등(1974)방법으로 측정하였다. 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

6. 통계처리

실험결과를 SAS를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 계산하였고, p<0.05 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 각 처리에 의한 유의차를 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 체중 및 간 무게의 변화

최종 체중, 간 무게와 체중당 간 무게비는 Table 2와 같다. 최종 체중은 발암원 처리에 의해 유의적으로 감소했다. 즉 발암원 처리군인 CTR+, CDI+, CDP+군이 대조군인 CTR, CDI, CDP에 비해 체중이 적었다. 이것은 DEN 처치와 AAF 보충 기간동안 발암원 처리군에

Table 2. Effect of citron tea supplement on the final liver weight, body weight and liver/body weight ratio

Group	Liver weight(g)	Body weight(g)	Liver/Body weight ratio(%)
CTR	11.99±1.02 ^a	548.17±27.04 ^a	2.17±0.07 ^b
CTR+	12.87±1.20 ^a	432.83±25.10 ^b	2.95±0.12 ^a
CDI	11.07±0.26 ^a	501.60±18.45 ^a	2.21±0.05 ^b
CDI+	12.66±0.76 ^a	434.00±17.44 ^b	2.92±0.14 ^a
CDP	11.19±0.42 ^a	527.17±21.27 ^a	2.13±0.05 ^b
CDP+	12.34±0.79 ^a	411.83±20.88 ^b	3.00±0.13 ^a

CTR : Control diet
 CTR+ : Carcinogen treatment
 CDI : Citron tea diet from initiation
 CDI+ : Carcinogen treatment with citron tea diet from initiation
 CDP : Citron tea diet from promotion
 CDP+ : Carcinogen treatment with citron tea diet from promotion

1) Values are mean±SE.
 2) Mean with the same alphabet are not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

서 식이섭취량이 감소했었던 것을 반영하였다. 그러나 체중이 유자차 보충으로 인한 영향은 별로 받지않아 발암원 처리군내에서나 대조군내에서는 차이를 보이지 않았다. 간 무게는 모든군에서 유의적 차이를 나타 내지 않았으나 체중당 간 무게비는 발암원처리군 (CTR+, CDI+, CDP+)이 대조군(CTR, CDI, CDP)에비 해 유의적으로 증가하였다.

2. 면역 조직화학적 검사

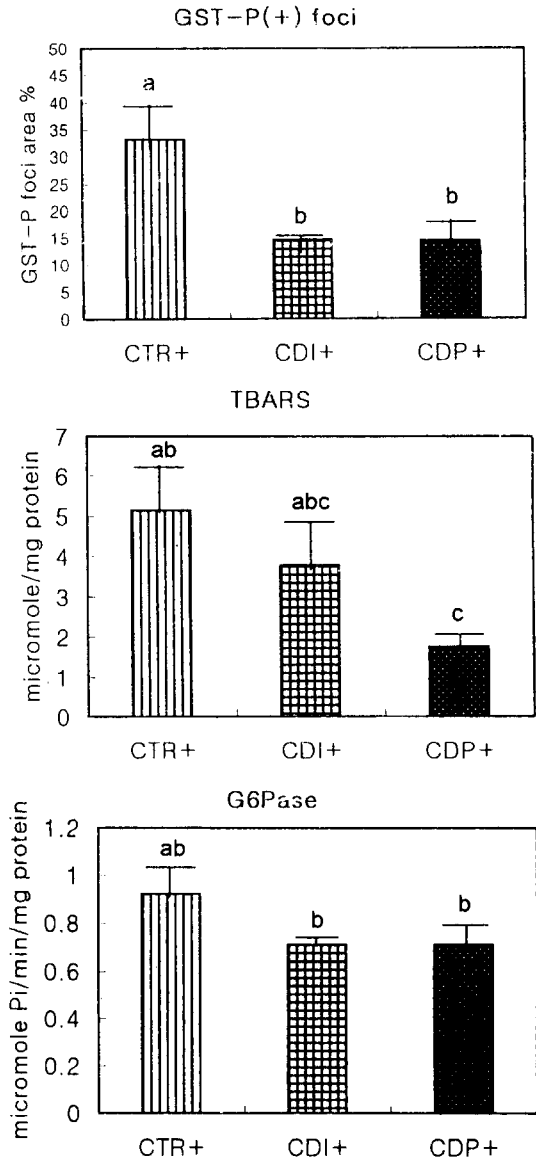


Fig. 2. Effects of citron tea supplement on the placental glutathione S-transferase(+) foci area, thiobarbituric acid reactive substances content, and glucose 6-phosphatase activity. CTR+ :carcinogen treatment with control diet, CDI+ :carcinogen treatment with citron tea diet from initiation, CDP+ :carcinogen treatment with citron tea diet from promotion

Fig. 2에서 보는 바와 같이 GST-P 양성 증식성 결절이 발암원 처리군에서 관찰되었는데 유자차 보충군(CDI+, CDP+)에서 유자차를 보충하지 않은 발암원 처리군(CTR+)에 비해 유의적으로 감소하였다. 그러나 CDI+와 CDP+ 사이에 유의적 차이가 없어, 유자차 섭취기간에 따라 전암성 병변의 면적이 달라지지 않았다.

3. 생화학적 검사

1) Cytochrome P450 함량

본 실험에서 총 P450 함량은 모든군에서 유의적 차이가 없었다. 이제까지 다른 연구에서 감귤류에 존재하는 flavonoids가 P450을 변화시켰다고 보고되었다. Siess 등(1995)은 감귤류에 존재하는 flavonoid의 일종인 tangeretin이 P450 1A계를 나타내는 ethoxyresorufin O-deethylase의 활성도는 억제시킨 반면, P450 3A3과 3A4를 나타내는 bezyloxyresorufin O-debezylyase는 증가시켰다고 보고하였다. 또한 다른 연구에서는 tangeretin이 총 P450 함량은 변화시키지 않았으나 ethoxyresorufin O-deethylase과 pentoxyresolufin dealkylase(P450 2B1, 2B2)는 증가시켰다고 보고하였다(Canivenc-Lavier, 1996). 감귤류 flavonoids인 tangeretin과 nobiletin이 benzo(a)pyrene과 aflatoxin B1의 P450 의존성 monooxygenase의한 활성화를 억제하는 결과를 보고하였다(Wood *et al*, 1986). 그러므로 본 실험에서 총 P450 함량은 차이가 없었으나 그 isozyme간에 차이가 있을 가능성을 배제할 수 없으므로 더 연구할 필요가 있다.

D-limonene을 식이의 1%수준으로 공급한 경우 P450함량에 변화가 없었으나, 5%수준으로 공급하였을 때 P450함량이 증가하였다는 보고(Maltzman *et al*,

1991)에 비추어 본 연구에서 사용한 식이내 5% 수준의 유자차는 P450을 유도하기에는 충분치 못한량일 수도 있다. 그러나 본 연구는 유자차를 일반적인 섭취 수준으로 장기간 섭취하였을 때 효과를 연구하기 위하여 유자차를 식이내 5% 수준으로 제공하였다.

2) Glutathione S-transferase 활성도

GST의 활성도는 발암원 처리군(CTR+, CDI+, CDP+)이 대조군(CTR, CDI, CDP)에 비해 유의적으로 증가하였다. 이것은 발암물질을 해독시키기위해 증가된 것으로 간세포암화 과정중에 관찰된다(Sato, 1988). 유자차 보충에따른 GST 활성도 차이는 관찰되지 않았다. 앞선 연구에서 감귤류 flavonoid중 tangeretin이나 quercetin을 식이의 0.3%(w/w)수준으로 보충한 경우 tangeretin은 GST 활성을 증가시키는 경향을 보였으나 quercetin의 경우 변화가 없었다(Canivenc-Lavier, 1996). 그러므로 본 실험에서 사용한 식이내 유자의 농도가 GST 활성도를 증가시킬만큼 충분하지 못하였던 것으로 생각된다.

3) 지질과산화물 생성량

본 실험에서는 지질과산화물인 malondialdehyde를 측정하기 위하여 thiobarbituric acid를 기질로 사용하였다. 그 결과 유자차의 보충에따라 그 경향이 다르게 나타났다. 유자차를 보충시키지않은 CTR과 CTR+에서는 발암원으로 처리한 CTR+군이 대조군인 CTR군에 비해 TBARS가 유의적으로 증가하였다. 그러나 유자차 보충군에서는 발암원 처리군인 CDI+과 CDP+의 지질과산화물 생성량은 대조군(CDI,CDP)에 비해 감소하는 경향을 보였다. 그러므로 유자차에 있는 항산화성분들이 발암원에의한 지질과산화물의 생성을 효과적

Table 3. Effect of citron tea supplement on the cytochrome P450 content, glutathione S-transferase activity, thiobarbituric acid reactive substances content and glucose 6-phosphatase activity.

Group	P450 (nmole/mg protein)	GST (μ mole/min/mg protein)	TBARS (μ mole/mg protein)	G6Pase (μ mole Pi liberated/min/mg protein)
CTR	0.66 \pm 0.13 ^a	1.20 \pm 0.09 ^b	2.10 \pm 0.73 ^c	1.10 \pm 0.19 ^a
CRT ⁺	0.95 \pm 0.09 ^a	2.32 \pm 0.26 ^a	5.14 \pm 1.07 ^{ab}	0.92 \pm 0.13 ^{ab}
CDI	0.91 \pm 0.06 ^a	0.88 \pm 0.05 ^b	5.80 \pm 0.38 ^a	0.90 \pm 0.14 ^{ab}
CDI ⁺	0.74 \pm 0.18 ^a	2.04 \pm 0.34 ^a	3.78 \pm 1.18 ^{abc}	0.71 \pm 0.02 ^b
CDP	0.99 \pm 0.23 ^a	1.13 \pm 0.05 ^b	3.18 \pm 0.63 ^{abc}	0.82 \pm 0.11 ^{ab}
CDP ⁺	1.10 \pm 0.13 ^a	2.11 \pm 0.030 ^a	1.74 \pm 0.28 ^c	0.71 \pm 0.09 ^b

CTR : Control diet

CRT⁺ : Carcinogen treatment

CDI : Citron tea diet from initiation

CDI⁺ : Carcinogen treatment with citron tea diet from initiation

CDP : Citron tea diet from promotion

CDP⁺ : Carcinogen treatment with citron tea diet from promotion

1) Values are mean \pm SE.

2) Mean with the same alphabet are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

으로 예방하였다고 보여지며, 이것이 전암성 병변의 감소에 기여하였을것으로 사려된다.

4) Glucose 6-Phosphatase 활성도

G6Pase는 간소포체막에 부착되어있는 막안정도를 나타내는 지표로 간세포가 손상되거나 종양생성시 활성도가 감소한다고 알려져있다(Will, 1971). 본 실험에서도 발암원 처리에의해 G6Pase 활성도가 감소되는 경향이 관찰되었고, 유자차를 공급받은 군에서 활성도가 감소되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의적이지 않았다.

IV. 결 론

간세포암을 유도하는 과정에서 GST-P 양성 병소가 관찰되었으며, GST 활성도, 지질과산화물 생성량이 유의적으로 증가하고, G6Pase는 감소하는 경향을 보였으며, cytochrome P450 함량은 변화가 없었다.

이결과는 발암원투여로 증가된 지질과산화물을 제거하기위해 GST의 활성도가 증가하였으나, 제거되지않은 지질과산화물에의해 소포체막이 손상되고(G6Pase 활성도 감소), 암화과정으로 진행되었음을 알 수 있다.

이때, 유자차를 식이내에 보충하면 지질과산화물함량이 감소하고, 전암성 병소(GST-P 양성 병소)의 면적이 줄어들었다. 그러나 유자차의 보충 시기에 의한 영향은 받지 않아, 발암원 개시이전 단계부터 보충하였을때나 촉진단계부터 보충하였을 때 차이가 없었다. 그러므로 유자차의 보충은 암화과정중 촉진단계에서 항암효과를 나타낼것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구에 사용된 유자차를 기증하여주신 동서식품과 Image Analyzer 사용에 협조하여 주신 주식회사태평양에 깊이 감사 드립니다.

참고문헌

- 정지훈 (1974): 한국산 유자의 화학적 성분에 관한 연구, 한국농화학회지, **17**(1), 63-79.
- Attaway, J.A. (1994): Citrus juice flavonoids with anticarcinogenic and antitumor properties in *Food phytochemicals for cancer prevention I Fruits and vegetables* (Huang, M.T., Osawa, T., Ho, C.T. and Rosen, R.T.), (American Chemical Society, Washington, D.C.), p240-248.
- Baginsk, E.S., Foa, P.P. and Zak, B. (1983): Glucose-

- 6-phosphatase In: *Methods of enzymatic analysis vol 2* (Bergmeyer, H.U.), (Academic Press, New York), p876-880.
- Bieri, J.G. (1980): Second report of the Ad Hoc committee on standards for nutritional studies, *J. Nutr.*, **110**, 1726.
- Bieri, J.G., Stoewsand, G.S., Briggs, G.M., Phillips, R. W., Woodard, J.C. and Kanapka, J.J. (1977): Report of the American institute of nutrition Ad Hoc committee on standards for nutritional studies, *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation in *Methods in enzymology vol 52* (Sidney, F. and Lestes, P.), (Academic Press, New York), p302-310.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1989): Mechanisms of antioxidant action: Preventive and chain-breaking antioxidants in *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine volume II* (Miguel, J., Quintanilha, A.T. and Weber, H.), (CRC, Boca Raton), p29-44.
- Butrum, R.R., Clifford, C.K. and Lanza, E. (1988): NCI dietary guidelines: rationale, *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 888-895.
- Canivenc-Lavier, M.C., Vernevaute, M.F., Totis, M., Siess, M.H., Magdalou, J. and Suschetet, M. (1996): Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver, *Toxicology*, **114**, 19-27.
- Committee on diet, nutrition, and cancer, Assembly of life sciences, National research council (1982): Diet, Nutrition, and Cancer (National academy press, Washington, D.C.), p144-148.
- Crowell, P.L. and Gould M.N. (1994): Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene, *Crit. Rev. Oncog.*, **5**, 1-22.
- Das, N.P. and Ratty, D.A. (1986): Effects of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation in Plant flavonoids in biology and medicine (Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J.B.), (Alan R Liss Inc, New York), p243-247.
- Degawa, M., Tanimura, S., Toshinori, A. and Hashimoto, Y. (1989): Hepatocarcinogenic heterocyclic aromatic amines that induce cytochrome P-448 isozymes, mainly cytochrome P-448H(P-450IA2), responsible for mutagenic activation of the carcinogens in rat liver, *Carcinogenesis*, **10**(6), 1119-1122.
- Ginter, E. (1989): Interactions between vitamins C and E and cytochrome P450 in *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine volume II* (Miguel, J., Quintanilha, A.T., and Weber, H.), (CRC, Boca Raton), p95-104.

- Guengerich, F.P. and Kim, D.H. (1990): In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxine B₁ activation in human liver microsome by naringenin and other flavonoids, *Carcinogenesis*, **11**(12), 2275-2279.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974): Glutathione S-transferase, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Hasegawa, S., Miyake, M. and Ozaki, Y. (1994): Biochemistry of citrus limonoids and their anticarcinogenic activity in *Food phytochemicals for cancer prevention I Fruits and vegetables* (Huang, M.T., Osawa, T., Ho, C.T. and Rosen, R.T.), (American Chemical Society, Washington, D.C.), p198-208.
- Horton, A.A. and Fairhurst, S. (1987): Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **18**, 27-79.
- Kefford, J.F. and Chandler, B.V. (1970): The chemical constituents of citrus fruits (Academic Press, New York), p39-42.
- Kitahara, A., Satoh, K., Nishimura, K., Ishikawa, T., Ruite, K., Sato, K., Tsuda, H. and Ito, H. (1984): Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.*, **44**, 2698-2703.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Maltzman, T.H., Christou, M., Gould, M.N. and Jefcoate, C.R. (1991) Effects of monoterpenoids on in vivo DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes, *Carcinogenesis*, **12**(11), 2081-2098.
- Negri, E., D'Avanzo, B. and Tarani, A. (1994): The role of vegetables and fruit in cancer risk in *Epidemiology of diet and cancer* (Hill, M.J., Giacosa, A. and Caygill, C.J.), (Ellis Horwood, London), p 327-334.
- Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2379.
- Salvayre, R., Negre, A., Affany, A., Lenoble, M. and Douste-Blazy, L. (1988): Protective effect of plant flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation of membranes. in *Plant flavonoids in biology and medicine II* (Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., and Beretz, A.), (Alan R Liss Inc, New York) p313-316.
- Sato, K. (1988): Glutathione S-transferases and hepatocarcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 556-572.
- Siess, M., Guillermic, M., Bon, A.M. and Suschetet, M. (1989): Induction of monooxygenase and transferase activities in rat by dietary administration of flavonoids, *Xenobiotica*, **19**(12) 1379-1386.
- Siess, M.H., Leclerc, J., Canivenc-Lavier, P. and Suschetet, M. (1995): Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes, *Toxicol. appl. pharmacol.*, **130**, 73-78.
- Steven, A.W. and Jeffrey, C.S. (1992): The human hepatic cytochrome P-450 involved in drug metabolism, *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**, 1-21
- Tappel, A.L. (1973): Lipid peroxidation damage to cell components, *Fed. Proc.*, **32**, 1870-1874.
- Tatematsu, M., Mera, Y., Inoue, T., Satoh, K., Sato, K. and Ito, N. (1988): Stable phenotypic expression of glutathione S-transferase placental type and unstable phenotypic expression of Γ -glutamyltransferase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesion, *Carcinogenesis*, **9**, 215-220.
- Voca, C.E. and Harms-Ringdahl, M. (1989): Nuclear membrane peroxidation products bind to nuclear macromolecule, *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 548-554.
- Wargovich, M.J. (1997): Experimental evidence for cancer preventive elements in foods, *Cancer Lett.*, **114**, 11-17.
- Wills, E.D. (1971): Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzyme of the endoplasmic reticulum, *Biochem. J.*, **123**, 983-991.
- Wood, A.W., Smith, D.S., Chang, R.L., Huang, M.T. and Conney, A.H. (1986): Effects of flavonoids on the metabolism of xenobiotics. in *Plant flavonoids in biology and medicine* (Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J.B.), (Alan R Liss Inc, New York), p195-210.