

β -carotene 첨가식이 고지혈증 쥐의 지질과산화물과 항산화효소 활성에 미치는 영향*

송영옥·천종희[§]

인하대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of β -carotene Supplementation on Lipid Peroxides and Antioxidative Enzyme Activities in Hyperlipidemic Rats*

Song, Young-Ok · Chyun, Jong-Hee[§]

Department of Food & Nutrition, Inha University, Inchon 402-751, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of dietary β -carotene supplementation on lipid metabolism and antioxidant enzyme activities in hyperlipidemic rats. Fifty Sprague-Dawley male rats aging 7 weeks were fed the control diet (CD, 5% corn oil) and the high fat diet (HFD, 15% beef tallow + 1% cholesterol) for 4 weeks and then 0.02% β -carotene was supplemented to CD and HFD group for 8 more weeks. Serum lipid compositions, lipid peroxides and antioxidative enzymes in liver were analyzed at 4, 8 and 12week of the experiment. Serum levels of total lipid, total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol were higher in HFD groups than in CD groups ($p < 0.001$). Serum levels of HDL-cholesterol were higher in CD groups than in HFD groups ($p < 0.01$). The effect of β -carotene supplementation was not significant in all groups but tended to be lower in total lipid, total cholesterol and triglyceride. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in plasma and liver were showed significantly higher in HFD groups ($p < 0.001$, $p < 0.05$). The effects of β -carotene supplementation on the level of plasma and liver TBARS were not found except HFD groups at 12 week. Liver conjugated diene levels in HFD groups were higher than in CD groups ($p < 0.01$), but the effect of β -carotene supplementation did not show any differences. Liver lipofuscin levels were not significantly different among all groups. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase were significantly lower in HFD groups at 8 week ($p < 0.001$) but were not significantly different at 4 and 12week. The activity of SOD in β -carotene supplemented HFD group was significantly higher at 8 week ($p < 0.01$). Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was significantly lower in HFD groups ($p < 0.01$) and was significantly increased in groups supplemented β -carotene ($p < 0.05$). It is suggested that β -carotene supplementation partly decreases the serum lipid and lipid peroxide levels and increases the activities of antioxidant enzymes in hyperlipidemic rats. (*Korean J Nutrition* 37(9): 771~779, 2004)

KEY WORDS : hyperlipidemic rats, high fat diet, β -carotene, TBARS, antioxidant enzymes.

서론

최근 우리나라는 식생활 양상의 서구화로 지방 섭취가 증가하여 이와 관련된 여러 가지 질병의 발생빈도가 높아지고 있다. 우리나라 국민의 총 에너지 섭취량 중 지방 에너지 섭취비율은 70년대에 6.3~11.8%, 80년대에는 9.0~14.7%

이었으며 98년에 19.0%, 2001년에는 19.5%로 증가하여¹⁾ 한국인 영양권장량²⁾에서 제시한 지방 에너지비 20%에 근접하였다. 또한 총 에너지의 20% 이상을 지방으로 섭취하는 인구도 39.3%에 달하고 있어 일부 계층의 지방 섭취는 상당히 높은 것으로 나타나고 있다.¹⁾ 이러한 지방 섭취의 증가는 질병 발생 양상에 변화를 주어 특히 고지혈증이 건강상의 심각한 문제로 대두 되고 있다.³⁾

최근 증가하고 있는 심혈관계질환의 위험인자는 여러 가지이나, 혈청 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 (LDL-C)의 농도 상승, 혈청 중성 지방증가 등 고지혈증이 주요 인자로 인식되고 있다.⁴⁾ Spady 등⁵⁾은 콜레스테롤 및 중성지

접수일 : 2004년 8월 12일

채택일 : 2004년 10월 12일

*This study was supported by 2002 research grant of Inha University

[§]To whom correspondence should be addressed.

방을 포함한 지방의 섭취 증가가 고콜레스테롤 혈증과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다. 특히, 포화지방의 과다 섭취는 혈청 콜레스테롤의 수준을 높여 심혈관계질환을 비롯한 여러 질환의 발생을 증가시키는 위험요인이 된다.^{6,7)}

더욱이 최근에는 고지혈증으로 인한 심혈관계질환의 발생에도 free radical이 관여함이 알려지고 있다. 즉 동맥벽에서 LDL-C의 산화가 죽종형성을 증가시키는 기전에 free radical이 작용하므로 이에 방어효과를 나타내는 것으로 알려진 항산화영양소들이 죽상동맥경화증 예방에 효과가 있다고 보고되고 있다.^{9,10)}

생체의 정상적인 대사 과정 중에서 생성되는 free radical은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) 등의 항산화 효소와 항산화 영양소들로 이루어진 체내 항산화 방어체계에 의하여 제거됨으로써 생명체를 과산화로부터 보호할 수 있다. 만약 이와 같은 항산화 방어체계 기전이 저하되거나 또는 free radical 생성증가 등으로 이들간의 균형이 깨어지게 되면 조직은 과산화적 손상을 입게 된다.

생체에 축적되는 지질과산화 반응의 산물로는 TBARS, lipofuscin, conjugated diene 등이 있다. Lipofuscin은 산화적 스트레스 증가와 항산화영양소 부족으로 축적되며 특히 mitochondria와 microsome의 지질과산화와 밀접한 관계를 가진다.¹¹⁾

또한 conjugated diene은 불포화지방산의 과산화반응 초기에 free radical이 methylen기의 수소를 공격하여 이중결합이 이동됨으로써 생성된다.¹²⁾

최근 지질과산화에 대한 비효소적 방어에 항산화영양소들의 중요성이 부각되면서 β -carotene의 항산화 능력에 대한 관심이 높아지고 있다. β -carotene은 식품 속에 매우 풍부한 양이 존재할 뿐 아니라 isoprene의 긴 사슬 앞뒤에 두 개의 ionone ring을 갖고 있어 높은 생리활성을 나타내므로 매우 우수한 비타민 A의 전구체로 알려져 있다. β -carotene의 작용기전으로는 retinoid로의 전환, 산화적 손상으로부터의 보호작용, β -carotene 분자자체의 생리적 활성 등을 생각할 수 있다.¹³⁾ β -carotene은 free radical연쇄반응을 중단시키는 항산화제로, 반응성이 강한 과산화기와 반응하여 유해하지 않은 비활성 부산물을 생성함으로써 과산화기와 불포화지방이 반응하여 손상을 초래하는 것을 막는다.¹⁴⁾ 이러한 β -carotene의 항산화성은 부분적으로 암, 동맥경화증, 관절염, 백내장 같은 질병을 유발시키는 산화적 스트레스로부터 신체를 방어하는데 중요하게 작용한다.¹⁵⁾ 한편 식이에 불포화 지방 섭취가 증가되면 지질과산화반응을 억제하기 위해 이러한 항산화 영양소의 필요량이 증가된

다고 보고되었다.¹⁶⁾

따라서 본 연구에서는 고지방식이 섭취를 통하여 고지혈증을 유도시킨 실험동물에게 β -carotene 보강식이 공급하여 β -carotene 보충과 첨가기간이 고지방섭취로 발생하는 체내 지질과산화물 형성 및 항산화효소 활성도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험식이

실험동물은 생후 5주된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 50마리를 구입하여 사육실 (실내 온도 20~22°C, 명암주기 12시간 cycle)에서 표준사료와 탈이온수를 완전 자유급식 (*ad libitum*)으로 2주간 공급하여 환경에 적응시킨 후, 7주령이 되어 평균체중이 약 180 g이 되었을 때 실험에 사용하였다.

실험 시작 후 첫 4주간은 정상지방식이군과 고지방식이군 두군으로만 나누어 실험식이를 공급하였고, 5주째 부터는 β -carotene 첨가 여부에 따라 각각의 군을 다시 두군으로 나누어 총 4군으로 만든 후 8주간 더 사육하여 총 실험기간을 12주로 하였다.

실험식이는 AIN (American Institute of Nutrition)-76의 정제식이 조성을 참고로 식이지방 수준과 β -carotene의 첨가 유무에 따라 정상지방식이 (CD), 정상지방 + β -carotene식이 (CD + β), 고지방식이 (HFD), 고지방 + β -carotene식이 (HFD + β)로 구성하였다.

식이지방의 수준은 5%를 기준으로 하여 정상지방식이군은 5%의 corn oil을 공급하였고 고지방식이군은 지방의 함량과 내용을 변화시켜 15% beef tallow에 1% cholesterol을 첨가하여 공급하였다. 식이 β -carotene의 수준은 Lee¹⁷⁾의 연구를 참고로 하여 0.2 g/kg diet (0.02%)으로 하였다.

실험식이는 분말 상태로 공급하였고, 식이 원료로는 정제된 카제인, 옥수수 전분, 설탕, 옥수수기름, 우지, β -carotene (Sigma, USA)을 사용하였으며 비타민 혼합물과 무기질 혼합물은 AIN-76의 조성표와 같이 조제하여 사용하였다.

실험동물은 스텐레스 스틸 사육장에 한 마리씩 분리하여 사육하였으며 물과 식이를 자유롭게 섭취하게 하였고, 식이 섭취량은 매일, 체중은 매주 한 번씩 측정하였다(Table 1)

2. 시료수집 및 전처리

채혈과 간 조직 추출은 실험식이를 4주간 공급 후, 8주간 공급 후, 12주간 공급 후에 각각 실시하였다.

실험동물은 희생시키기 전 12시간 절식 시키고, ethyl ether

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

Ingredients ¹⁾	CD	CD + β	HFD	HFD + β
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0
DL-methionine	3.0	3.0	3.0	3.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0
Beef tallow	-	-	150.0	150.0
Cholesterol	-	-	10.0	10.0
Corn starch	520.0	520.0	110.0	110.0
Sucrose	130.0	130.0	430.0	430.0
α -cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0
Vitamin mixture ²⁾	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture ³⁾	35.0	35.0	35.0	35.0
Choline bitartrate	2.0	2.0	2.0	2.0
β -carotene	-	0.2	-	0.2

CD: 5%corn oil,

CD + β : 5%corn oil + 0.02% β -carotene

HFD: 15% beef tallow + 1% cholesterol

HFD + β : 15% beef tallow + 1% cholesterol + 0.02% β -carotene Groups (N)

1) 카제인 (Murray Goulburn, 호주산), 옥수수 전분 (성진식품), 설 탕 (제일제당), 옥수수기름 (제일제당), 우지 (하인즈), β -carotene (Sigma: U.S.A)

2) Composition of vitamin mixture

1.0% in diet provide the following vitamins (mg/kg diet)

Thiamin HCl 6.0 mg, Riboflavin 6.0 mg, Nicotinic acid 30.0 mg, Calcium pantothenate 16.0 mg, Folic acid 2.0 mg, Cyanocobalamin 10.0 μ g, Biotin 0.2 mg, Vitamin A 4000 I.U., Vitamin D1000 I.U., Vitamin E 50 I.U., Vitamin K 50.0 μ g, Pyridoxine HCl 7.0 mg

3) Composition of mineral mixture

3.5% in diet provided the following mineral (mg/kg diet), Calcium (calcium phosphate, dibasic) 5200.0, Phosphorus (calcium phosphate, dibasic) 4000.0, Sodium (sodium chloride) 1020.0, Potassium (potassium citrate, H₂O) 3600.0, Magnesium (magnesium oxide) 500.0, Manganese (manganese carbonate) 54.0, Iron (ferric chloride) 35.0, Copper (cupric carbonate) 6.0, Zinc (zinc carbonate) 30.0, Iodine (potassium iodide) 0.2, Selenium (sodium selenite · 5H₂O) 0.1, Chromium (chromium potassium sulfate · 12H₂O) 2.0, Chloride (sodium chloride) 1560.0, Sulfate (potassium sulfate) 1000.0

로 마취시킨 뒤 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 간장은 적출하여 생리 식염수 (0.9%)로 충분히 세척하여 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 액체질소로 급속 냉동시켜 -70°C에 냉동 보관했다가 지질농도와 항산화효소활성 측정에 사용하였다.

해파린 처리된 시험관을 사용하여 채취한 혈액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈장을 분리한 후 즉시 TBARS 분석에 사용하였다. Polyethylen tube에 채취한 혈액은 실온에 약 1시간 방치 후 3000 rpm (4°C)에서 15분간 원심분리하여 만들었으며, 분석 전까지 -70°C에서 냉동 보관한후 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-C 농도를 분석하였다.

3. 분석방법

1) 혈청지질

총 지질의 농도는 Frings과 Dunn의 sulfophosphovanil-

lin 방법¹⁸⁾으로 UV-visible spectrophotometer (HP 8435, Hewlett Packard, U.S.A)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-C은 효소법을 이용한 kits (영동제약)를 사용하여 효소비색법으로 측정하였다. LDL-C, VLDL-C는 Friedewald식을 이용하여 계산하였다.¹⁹⁾

2) TBARS

혈장과 간의 TBARS 함량은 2-thiobarbituric acid 방법²⁰⁾을 이용하여 UV-visible spectrophotometer (HP 8435, Hewlett Packard, U.S.A)로 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다.

3) lipofuscin과 conjugated diene 함량

간의 균질액에서 지방을 추출한 후 그 추출액에서 lipofuscin 및 conjugated diene의 함량을 측정하였다.

Lipofuscin은 spectrofluorometer를 이용하여 excitation 파장 380 nm, emission 파장 480 nm에서 형광도를 측정하였고 blank로는 chloroform을 사용하였다.²⁰⁾ Conjugated diene은 Recknagel과 Glende의 방법을 이용하여 UV-visible spectrophotometer (HP 8435, Hewlett Packard, U.S.A)로 234 nm에서 흡광도를 측정하였다.²¹⁾

4) 항산화 효소 활성도

간의 cytosol에서 SOD의 활성은 Misra와 Fridorich의 방법을 이용하였다.²²⁾ 간의 mitochondria에서 catalase 활성도는 Aebi의 방법²³⁾을 이용하여 측정하였다. 간의 cytosol에서 GSH-Px 활성도는 Tappel의 방법²⁴⁾을 이용하였다.

단백질 정량은 bovine serum albumin 표준 단백질 용액을 사용하여 Lowry 등의 방법²⁵⁾을 이용한 Protein Assay Kit (Sigma, U.S.A)를 사용하여 비색정량 하였다.

4. 통계처리

각 실험의 결과는 SAS version 8.1 program을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 계산하였고 ANOVA test 후에 Duncan's multiple range test에 의해 p < 0.05 수준이상에서 유의성을 검증하였다. 4주 짜 CD와 HFD군 간에 따른 유의적 변화의 차이는 Student's t-test로 분석하였고 지질 수준과 β -carotene 첨가 유무에 따라서는 2-way ANOVA을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

각 실험군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율 (food

efficiency ratio : FER)은 Table 2에 나타내었다.

체중증가량은 4주까지는 정상지방식이 (CD)군보다 고지방식이 (HFD)군에서 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), 5~8주에서는 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면에

9~12주에서는 정상지방식이군보다 고지방식이군에서 체중증가량이 유의하게 낮았고 ($p < 0.01$), 고지방식이군은 체중 감소현상을 보였다. 이는 고지방식이섭취가 계속됨에 따라 식이 섭취량이 감소하였기 때문인 것으로 사료된다.

Table 2. Weight gain, food intake and food efficiency ratio in rats fed experimental diet

Groups (N)		Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER ¹⁾
1 - 4 week	CD (24)	6.25 ± 2.47 ^{2) *3)}	17.70 ± 0.39 ^{NS}	0.02 ± 0.01 [*]
	HLD (24)	21.00 ± 6.36	18.32 ± 1.45	0.06 ± 0.02
5 - 8 week	CD (8)	24.25 ± 2.72 ^{NS}	17.06 ± 0.96 ^{abd)}	0.06 ± 0.01 ^{ob}
	CD + β (8)	32.83 ± 16.00	19.10 ± 0.43 ^a	0.08 ± 0.03 ^a
	HLD (7)	22.00 ± 17.52	15.60 ± 1.93 ^b	0.04 ± 0.01 ^b
	HLD + β (8)	27.17 ± 20.59	16.98 ± 1.42 ^{ob}	0.09 ± 0.04 ^a
Significant factor ⁵⁾		fat ^{NS} , β ^{NS}	fat [*] , β [*]	fat ^{NS} , β [*]
9 - 12 week	CD (4)	28.00 ± 11.53 ^a	17.00 ± 1.45 ^{ab}	0.06 ± 0.02 ^a
	CD + β (4)	16.20 ± 6.22 ^{ob}	18.87 ± 0.58 ^a	0.04 ± 0.01 ^{ob}
	HFD (3)	-6.20 ± 14.69 ^b	14.34 ± 0.93 ^c	-0.02 ± 0.04 ^b
	HFD + β (3)	-3.17 ± 22.70 ^b	16.48 ± 2.23 ^b	-0.01 ± 0.07 ^b
Significant factor		fat ^{**} , β ^{NS}	fat [*] , β ^{NS}	fat [*] , β ^{NS}

CD: 5% corn oil, CD + β : 5% corn oil + 0.02% β -carotene, HLD: 15% beef tallow + 1% cholesterol

HLD + β : 15% beef tallow + 1% cholesterol + 0.02% β -carotene

1) Food Efficiency Ratio, weight gain (g)/food intake (g)

2) Values are mean ± SD

3) Statistical significance between CD and HFD was evaluated by student t-test

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

4) Means with different superscript within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

5) Statistical significance of factors was calculated by 2-way ANOVA

fat: dietary fat level, β : β -carotene supplementation

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

Table 3. Serum lipid levels in rats fed experimental diet

Groups (N)		Total Lipid	Total cholesterol	Triglyceride
4 week	CD (8)	231.05 ± 39.53 ^{1) *2)}	62.37 ± 3.09 [*]	53.77 ± 5.86 ^{NS}
	HFD (8)	422.77 ± 44.16	101.43 ± 26.21	89.85 ± 27.28
8 week	CD (4)	236.45 ± 27.51 ^{b3)}	58.23 ± 27.30 ^b	66.07 ± 3.72 ^{bc}
	CD + β (4)	123.50 ± 33.80 ^c	63.78 ± 16.37 ^b	58.08 ± 4.24 ^c
	HFD (3)	378.03 ± 69.91 ^a	105.97 ± 26.40 ^a	82.83 ± 17.91 ^{ob}
	HFD + β (4)	312.83 ± 17.57 ^{ob}	96.33 ± 17.44 ^{ab}	87.69 ± 11.14 ^a
Significant factor ⁴⁾		fat ^{***} , β ^{**}	fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{**} , β ^{NS}
12 week	CD (4)	226.30 ± 31.44 ^b	60.07 ± 5.18 ^b	56.46 ± 7.16 ^b
	CD + β (4)	217.65 ± 6.29 ^b	52.08 ± 16.75 ^b	76.95 ± 17.38 ^{ob}
	HFD (3)	351.73 ± 62.50 ^b	115.90 ± 10.85 ^a	109.51 ± 29.29 ^a
	HFD + β (3)	323.65 ± 2.47 ^b	92.20 ± 20.70 ^a	88.34 ± 28.86 ^{ob}
Significant factor		fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{***} , β ^{NS}	fat [*] , β ^{NS}

CD: 5% corn oil, CD + β : 5% corn oil + 0.02% β -carotene, HFD: 15% beef tallow + 1% cholesterol

HFD + β : 15% beef tallow + 1% cholesterol + 0.02% β -carotene

1) Values are mean ± SD

2) Statistical significance between CD and HFD was evaluated by student t-test

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

3) Means with different superscript within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of factors was calculated by 2-way ANOVA

fat: dietary fat level, β : β -carotene supplementation

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

식이섭취량은 4주 사육까지는 군간 유의한 차이를 보이지 않았으나 5주째부터 정상지방식이군이 고지방식이군보다 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 식이 열량이 높을수록 섭취량이 감소한다는 Katan 등²⁶⁾의 보고와 일치하며 식이 지방의 섭취로 인하여 체내에서 gastric emptying이 지연²⁷⁾되어 식이 섭취량이 감소하는 것으로 사료된다. β -carotene 첨가에 따라서는 8주 사육시에 유의하게 식이섭취량이 증가하는 경향을 보였다 ($p < 0.05$).

식이효율은 4주까지는 고지방식이군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 약 15% 지방을 함유한 고지방식을 급여하였을 때 식이 섭취량은 정상군에 비하여 감소하나 식이효율은 증가한다는 Sung 등²⁸⁾의 결과와 일치하였다. 고지혈증이 유발된 5주째부터는 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 식이효율이 감소하는 경향을 보이다가 9주 이후에는 유의하게 감소되는 결과를 보였다.

2. 혈청 지질 농도

1) 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방

혈청 중의 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방의 함량은 Table 3에 나타내었다.

고지방식을 4주간 공급한 군 (HFD)의 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방 농도는 각각 422.77 mg/dl, 101.43 mg/dl, 89.85 mg/dl이었다. 이를 같은 주령의 정상지방식을 공급한 군 (CD)의 혈청 지질 농도 231.05 mg/dl, 62.37

mg/dl, 53.77 mg/dl와 각각 비교해 보면 본 실험의 고지방식이군의 쥐에서는 고지혈증이 유발되었음을 알 수 있었다.²⁹⁾ 실험 4주, 8주, 12주째 모두 혈청 총 지질 ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.01$)과 총 콜레스테롤 농도 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)는 정상지방식이군보다 고지방식이군에서 유의하게 높았다. 혈청 중성지방 농도도 8주와 12주에서 군간 유의한 차이를 보여 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) 정상지방식이군보다 고지방식이군에서 높았다. 이러한 결과는 고지방·고콜레스테롤 급여 시 혈중 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤 농도가 정상지방식을 급여했을 때 보다 훨씬 높았다 는 O 등의 보고와 일치하였다.³⁰⁾

β -carotene 첨가에 따른 총 지질 농도는 실험 8주째에 β -carotene 첨가군에서 유의하게 감소됨을 보였고 ($p < 0.01$), 실험 12주째에는 실험군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나 첨가군에서 총 지질 농도가 감소하는 경향을 보였다. 총 콜레스테롤과 중성지방 함량은 β -carotene 첨가에 따른 유의적인 차이가 없었다.

2) 혈청 저단백 콜레스테롤 농도와 동맥경화지수

혈청 HDL-C, LDL-C, VLDL-C의 함량과 동맥경화지수 (Atherogenic index : AI)는 Table 4에 나타내었다.

혈청 HDL-C의 수준은 실험 전 기간 동안 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 유의하게 낮았으며 ($p < 0.01$) 반면에 LDL-C, VLDL-C의 수준은 4주, 8주, 12주째 각

Table 4. Serum lipoprotein cholesterol levels and Atherogenic index in rats fed experimental diet

Groups (N)		HDL-C (mg/dl)	LDL-C ¹⁾ (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	AI
4 week	CD (8)	43.26 ± 4.03 ^{2)***3)}	11.78 ± 2.85 [*]	10.75 ± 1.18 [*]	0.45 ± 0.06 [*]
	HFD (8)	21.44 ± 6.07	61.87 ± 26.28	19.65 ± 5.27	4.47 ± 2.12
8 week	CD (4)	38.04 ± 10.76 ^{ab4)}	8.53 ± 1.43 ^b	13.21 ± 0.75 ^b	1.74 ± 1.08 ^b
	CD + β (4)	49.94 ± 15.39 ^a	8.63 ± 4.15 ^b	11.62 ± 0.85 ^b	0.37 ± 0.20 ^b
	HFD (3)	23.22 ± 5.73 ^b	71.35 ± 20.34 ^a	17.64 ± 3.08 ^a	7.13 ± 3.64 ^a
	HFD + β (4)	29.41 ± 15.65 ^b	46.68 ± 31.48 ^a	17.54 ± 2.23 ^a	2.37 ± 1.09 ^b
Significant factor ⁵⁾		Fat ^{**} , β ^{NS}	Fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{**} , β ^{NS}	fat [*] , β [*]
12 week	CD (4)	31.97 ± 6.02 ^{ab}	16.83 ± 1.89 ^b	11.29 ± 1.43 ^b	0.88 ± 0.16 ^b
	CD + β (4)	35.81 ± 10.00 ^a	18.30 ± 11.29 ^b	13.93 ± 2.32 ^b	0.20 ± 0.10 ^b
	HFD (3)	21.25 ± 1.66 ^b	63.80 ± 24.61 ^a	21.90 ± 5.86 ^a	4.61 ± 2.09 ^a
	HFD + β (3)	23.65 ± 2.21 ^b	49.03 ± 20.17 ^{ab}	17.67 ± 5.77 ^{ab}	3.82 ± 0.86 ^a
Significant factor		Fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{**} , β ^{NS}	Fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{***} , β ^{NS}

1) LDL-C = Total cholesterol - (HDL-C + TG/5), VLDL-C = Total cholesterol - (HDL-C + LDL-C)
Atherogenic index (AI) = total cholesterol-HDL-C/HDL-C

2) Values are mean ± SD

3) Statistical significance between CD and HFD was evaluated by student t-test

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

4) Means with different superscript within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

5) Statistical significance of factors was calculated by 2-way ANOVA

fat: dietary fat level, β : β -carotene supplementation

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

각 고지방식이군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). 이러한 결과는 고지방식이에 따른 혈청 지질 농도 변화에 있어서 고지방-유지군이 LDL-C 수준이 높고 HDL-C 수준이 낮았다는 Kim 등의 연구보고와 일치하였다.³¹⁾ β -carotene 첨가에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았으나 HDL-C 수준은 정상지방식이군과 고지방식이군 모두에게서 β -carotene을 첨가한 군에서 높은 경향을 보였다. LDL-C 수준은 고지방식이군에서만 β -carotene 첨가 시 감소하는 경향을 보였다. VLDL-C 수준은 β -carotene 첨가에 따라 일관적인 변화를 보이지 않아 항산화영양소 보충이 VLDL-C 수준을 현저하게 낮추었다는 Kang의 보고와는 일치하지 않았다.³²⁾

AI는 4주, 8주, 12주 짜 모두 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). 이는 고지방식이 섭취로 인한 혈 중 총콜레스테롤 농도의 증가에 비해 HDL-C 농도가 증가되지 못하여 콜레스테롤을 말초조직으로부터 간으로 원활히 운반하지 못한 결과라 할 수 있다.³³⁾ β -carotene 첨가에 따라서는 실험 8주째에 β -carotene을 첨가한 고지방식이군에서 AI가 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). 실험 12주 째에는 유의적 차이는 없었으나 β -carotene 첨가군이 첨가하지 않은 군에 비해 AI가 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 결과는 β -carotene 공급이 혈 중 지질 수준을 감소시키고 HDL-C 수준을 증가시켰다

는 Choi 등³⁴⁾과 Willette 등³⁵⁾의 보고와 유사한 경향을 보였다. Framingham Heart study에서는 AI가 3.5이하이면 관상동맥 질환의 발생 위험으로부터 안전한 수준이며, 적어도 4.5이하를 유지하도록 권장하고 있다.³⁶⁾

3. 지질과산화물 농도

혈장과 간의 TBARS 함량, 간의 conjugated diene 및 lipofuscin 함량은 Table 5에 나타내었다.

지질과산화반응의 산물인 malondialdehyde (MDA)를 나타내는 TBARS 함량은 식이 지방 수준에 따라 유의적인 차이를 보여 혈장 TBARS 함량은 실험 4주, 8주, 12주 짜에서 각각 정상지방식이군보다 고지방식이군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). β -carotene 첨가에 따라서는 8주와 12주에서 모두 고지방식이군에서만 β -carotene 첨가군이 유의적으로 낮은 혈장 TBARS 함량을 보였다 ($p < 0.05$). 정상지방식이군에서는 유의적인 차이는 없었다. 간조직의 TBARS 함량은 4주, 8주, 12주 모두 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), β -carotene 첨가에 따라서는 유의하지는 않았으나 정상지방식이와 고지방식이 모두에서 감소되는 경향을 보였다.

Conjugated diene은 불포화지방산의 과산화 반응초기에 free radical이 methylen기의 수소를 공격하여 이중결합이 이동됨으로써 생성되며 지질과산화 반응의 지표로 사용될

Table 5. Lipid peroxide contents in rats fed experimental diet

Groups (N)		Plasma TBARS (nm/mg protein)	Liver TBARS (nm/mg protein)	Conjugated diene (O.D/mg lipid)	Lipofuscin (fluorescence/10mg protein)
4 week	CD (8)	4.62 ± 0.41 ^{1) **2)}	5.70 ± 0.54 [*]	0.36 ± 0.09 ^{NS}	12.93 ± 2.89 ^{NS}
	HFD (8)	8.25 ± 0.25	11.11 ± 2.75	0.53 ± 0.03	15.90 ± 3.88
8 week	CD (4)	4.00 ± 0.83 ³⁾	5.59 ± 0.68 ^{ab}	0.32 ± 0.10 ^{bc}	11.04 ± 2.38 ^{NS}
	CD + β (4)	3.93 ± 0.11 ^c	4.08 ± 1.46 ^b	0.25 ± 0.03 ^c	11.65 ± 2.57
	HFD (3)	6.58 ± 0.77 ^a	8.51 ± 4.10 ^o	0.54 ± 0.11 ^o	15.93 ± 5.30
	HFD + β (4)	5.27 ± 1.12 ^b	7.37 ± 0.82 ^{ab}	0.43 ± 0.11 ^{ab}	12.28 ± 3.70
Significant factor ⁴⁾		Fat ^{***} , β ^{NS}	fat [*] , β ^{NS}	Fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{NS} , β ^{NS}
12 week	CD (4)	4.30 ± 0.41 ^{bc}	6.67 ± 1.14 ^{ab}	0.33 ± 0.11 ^b	11.17 ± 1.96 ^{NS}
	CD + β (4)	4.03 ± 0.60 ^c	5.44 ± 1.91 ^p	0.29 ± 0.07 ^b	10.71 ± 1.65
	HFD (3)	7.09 ± 1.05 ^o	8.78 ± 2.49 ^o	0.50 ± 0.09 ^o	15.83 ± 4.48
	HFD + β (3)	5.54 ± 1.23 ^p	6.19 ± 1.12 ^{ab}	0.40 ± 0.11 ^{ab}	12.94 ± 3.00
Significant factor		fat ^{***} , β [*]	fat [*] , β ^{NS}	fat ^{**} , β ^{NS}	fat ^{NS} , β ^{NS}

CD: 5% corn oil, CD + β : 5% corn oil + 0.02% β -carotene, HFD: 15% beef tallow + 1% cholesterol

HFD + β : 15% beef tallow + 1% cholesterol + 0.02% β -carotene

1) Values are mean ± SD

2) Statistical significance between CD and HFD was evaluated by student t-test

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

3) Means with different superscript within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of factors was calculated by 2-way ANOVA

fat: dietary fat level, β : β -carotene supplementation

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively

수 있는 물질이다.¹²⁾ 본 연구에서 간의 conjugated diene의 함량은 실험 4주 째에는 고지방식이군에서 더 높았으나 유의한 차이는 없었고, 8주와 12주 째에는 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.01$). β -carotene 첨가에 따라서는 유의한 차이는 보이지 않았으나 정상지방 식이와 고지방식이 모두에서 β -carotene 첨가시 conjugated diene 함량이 약간 낮은 경향을 보였다.

Lipofuscin은 산화적 스트레스의 증가에 의해 축적이 증가되는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 본 연구에서 사용된 동물의 간 lipofuscin 함량은 모든 기간에 있어 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 높은 경향이었으나 유의적인 차이는 보이지 않았으며 β -carotene 첨가에 따라서는 고지방식이군에서만 유의하지는 않았으나 낮은 경향을 보였다.

4. 항산화효소 활성도

고지방식이와 β -carotene의 첨가에 따른 간 조직 내 항산화효소활성도 변화를 살펴보기 위해 SOD, catalase 및 GSH-Px의 활성도를 측정하여 그 결과는 Table 6에 나타내었다.

간의 cytosol에서 SOD와 catalase 활성도는 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 8주 째에는 유의하게 낮았으며 ($p < 0.001$), 4, 12주에서도 유의하지는 않았지만 낮은 경향을 보였다. β -carotene 첨가에 따라서는 8주 째와 12주 째 각각 SOD 활성도가 유의하게 증가됨을 보였

다 ($p < 0.01, p < 0.05$). 이는 β -carotene이 다른 항산화 물질에 비해 활성산소에 대한 포획효과가 뛰어나다는 Choi 등,³⁴⁾ Packer 등¹⁰⁾의 보고와 연관지어 생각해 볼 때 SOD에 의해 분해될 활성산소가 β -carotene의 작용으로 감소되어 SOD 활성도를 높인 것으로 사료된다. β -carotene 첨가에 따라 catalase의 활성도는 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 오히려 β -carotene 첨가군에서 활성도가 감소하는 경향을 보였는데 이는 β -carotene 첨가가 SOD활성의 증가와 동시에 catalase의 활성을 감소시켰다는 Choi 등³⁴⁾의 보고와 일치했다.

GSH-Px의 활성도는 4주, 8주, 12주 모든 기간에 정상지방식이군에 비해 고지방식이군에서 유의하게 낮은 경향을 보였다 ($p < 0.01, p < 0.001, p < 0.01$). 이러한 결과는 고지방식이를 급여한 군에서 대조군에 비해 GSH-Px의 활성도가 낮았다는 Choi²⁷⁾의 결과와 일치하였다. β -carotene 첨가에 따라서는 모든 공급 기간에 첨가군에서 유의하게 활성도가 증가되었다 ($p < 0.05$).

요약 및 결론

본 연구에서는 고지방식이를 통하여 고지혈증을 유도시킨 흰쥐에게 β -carotene 보강식이를 공급하여 체내 지질 과산화물 생성 및 항산화효소 활성도에 미치는 영향을 알

Table 6. Liver antioxidant enzyme activities in rats fed experimental diet

Groups (N)		SOD (unit/mg protein)	Catalase (nmoles H ₂ O ₂ decomposed/ mg protein)	GSH-Px (nmoles NADPH oxidized/ mg protein)
4 week	CD (8)	1.12 ± 0.59 ^{1)NS2)}	118.21 ± 19.61 ^{NS}	16.48 ± 3.43 ^{**}
	HFD (8)	0.58 ± 0.14	80.77 ± 3.37	2.54 ± 2.12
8 week	CD (4)	0.93 ± 0.09 ³⁾	142.01 ± 53.63 ^o	11.27 ± 2.84 ^o
	CD + β (4)	1.27 ± 0.12 ^o	127.26 ± 34.36 ^o	16.58 ± 1.85 ^o
	HFD (3)	0.44 ± 0.22 ^c	77.76 ± 15.75 ^b	2.19 ± 2.02 ^c
	HFD + β (4)	0.72 ± 0.29 ^{bc}	52.05 ± 4.40 ^b	5.58 ± 4.18 ^c
Significant factor ⁴⁾		fat ^{***} , β ^{**}	Fat ^{***} , β ^{NS}	Fat ^{***} , β [*]
12 week	CD (4)	0.63 ± 0.27 ^b	80.65 ± 13.39 ^{NS}	7.62 ± 2.05 ^b
	CD + β (4)	1.18 ± 0.37 ^o	56.04 ± 11.17	16.91 ± 10.08 ^o
	HFD (3)	0.62 ± 0.15 ^b	54.64 ± 22.90	1.14 ± 1.13 ^b
	HFD + β (3)	0.68 ± 0.27 ^b	52.51 ± 15.71	5.41 ± 2.02 ^b
Significant factor		fat ^{NS} , β [*]	fat ^{NS} , β ^{NS}	fat ^{**} , β [*]

CD: 5% corn oil, CD + β : 5% corn oil + 0.02% β -carotene, HFD: 15% beef tallow + 1% cholesterol
HFD + β : 15% beef tallow + 1% cholesterol + 0.02% β -carotene

1) Values are mean ± SD

2) Statistical significance between CD and HFD was evaluated by student t-test

NS: not significant

*, **, ***: significant at $p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001$ respectively

3) Means with different superscript within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of factors was calculated by 2-way ANOVA

fat: dietary fat level, β : β -carotene supplementation

NS: not significant cholesterol + 0.02% β -carotene

아보았다.

실험동물로는 생후 7주 된 Sprague-Dawley계 숫쥐 50마리를 사용하였다. 처음 4주간은 정상지방식이군 (5% corn oil)과 고지방식이군 (15% beef tallow + 1% cholesterol)으로만 나누어 실험식이를 급여하여 고지방식이군에서 실험적으로 고지혈증을 유발하였다. 그 후 대조군인 정상지방식이군과 고지방식이군을 다시 0.02% β -carotene 보충 여부에 따라서 보충하지 않은 군과 보충한 군으로 나누어 총 4군으로 한후 8주간 더 사육하여 총 실험기간을 12주로 하였다.

실험 4주, 8주, 12주 경과 후에 각군의 쥐를 3~4마리씩 희생시켜 혈액과 간을 수집하였다. 혈청에서 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, AI를 측정하였고 간과 혈장에서는 지질과산화물인 TBARS를, 또한 간에서 lipofuscin, conjugated diene 함량, 항산화 효소인 SOD, catalase, GSH-Px 활성도를 측정하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 체중증가량은 1~4주까지 정상지방식이군보다 고지방식이군이 유의하게 높아졌던 반면에 9~12주에서는 상반된 결과를 보였으며, β -carotene 첨가에 따라서는 군간 유의한 차이를 보이지 않았다. 식이섭취량은 1~4주까지 고지방식이군에서 높은 경향을 보였으나 4주 이후부터 정상지방식이군이 고지방식이군 보다 유의하게 높아졌고, β -carotene 첨가군에서 유의하게 높았다. 식이섭취효율은 8주까지 모든 군에서 유의적인 차이가 없었던 반면에 9~12주째 고지방식이군에서 유의하게 낮아졌다. β -carotene 첨가에 따라서는 4~8주째에서 유의한 차이를 보여 첨가군이 더 높게 나타났다.

2) 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL-C, VLDL-C 수준은 고지방식이군이 정상지방식이군 보다 유의적으로 높은 반면에 혈청 HDL-C 수준은 상반된 결과를 보였다. β -carotene 첨가에 따라서는 모든 군에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방의 수준은 낮아지는 경향을 보였다. 동맥경화지수는 고지방식이군이 정상지방식이군 보다 유의적으로 높았으며, β -carotene 첨가에 따라서는 8주째에 고지방식이군에서만 감소하였다.

3) 혈장과 간의 TBARS 함량은 고지방식이군이 정상지방식이군보다 유의하게 높았으며 β -carotene 첨가에 따라서는 낮아지는 경향을 보였고, 12주째에는 고지방식이군에서 β -carotene을 첨가한 경우 혈장 TBARS가 유의하게 낮았다. 간 conjugated diene 함량은 유의하게 고지방식이군에서 높았으며 β -carotene 첨가에 따라서 유의하지는

않았지만 낮은 경향을 보였다. 간 lipofuscin 함량은 유의하지는 않았으나 고지방식이군에서 높은 경향을 보였으며 β -carotene 첨가시 고지방식이군에서만 낮아지는 경향이였다.

4) 간 SOD 활성도는 8주 째 유의하게 고지방식이군이 정상지방식이군에 비해 활성도가 낮았으며 β -carotene 첨가시 유의적으로 활성도가 증가하였다. 간 catalase 활성도는 8주 째 고지방식이군이 정상지방식이군에 비해 유의하게 낮은 경향을 보였으며 β -carotene 첨가효과는 없었다. 간 GSH-Px 활성도는 고지방식이군에서 정상지방식이군보다 유의하게 낮아지는 경향을 보였으며 β -carotene 첨가군에서 유의하게 증가함을 보였다.

이상의 결과 고지방식이 섭취는 혈중 지질수준, 간의 지질과산화물, 항산화효소 활성에 영향을 준 것으로 보이며 또한, 고지혈증 쥐에 β -carotene을 식이로 첨가하면 혈중 지질수준 및 지질과산화물 생성을 부분적으로 감소시키고 항산화효소 활성도 부분적으로 증가시키는 것으로 보인다. 따라서 고지혈증 및 고지혈증으로부터 유발될 수 있는 심혈관 질환의 예방 및 치료를 위해서는 지방의 섭취 수준을 감소시키는 한편 β -carotene과 같은 항산화영양소의 보충섭취에 대한 고려도 필요하다고 본다.

Literature cited

- 1) Report on 2001 National Health and Nutrition Survey (Nutrition Survey), Ministry of Health and Welfare, 2002
- 2) Recommended Dietary Allowances for Koreans, 7th revision, The Korean Nutrition Society, Seoul, 2000
- 3) Lee YC. Hypercholesterolemia in Korea and nutritional factors. *J Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis* 1: 111-122, 1991
- 4) Jang SJ, Park YJ. Effects of dietary fiber sources and levels on lipid metabolism in rats fed high lard diet. *Korean J Nut* 28(2): 107-114, 1995
- 5) Spady DK, Wodlett LA, Dietschy JM. Regulation of plasma fatty acids. *Ann Rev Nutr* 13: 355-381, 1993
- 6) Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Muesing RA, Chen SC, Weststrate JA, Meijer GW, Wittes J, Lichtenstein AH, Vilella-Bach M, Schaefer EJ. Effects of margarine compared with those of butter on blood lipid profiles related to cardiovascular disease risk factors in normolipidemic adults fed controlled diets. *Am J Clin Nutr* 68: 768-777, 1998
- 7) Sanders TA, Oakley FR, Miller GJ, Mitropoulos KA, Crook D, Oliver MF. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3449-3460, 1997
- 8) Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and

- tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426, 1982
- 9) Sarataho EP, Nyyssonen K, Salonen JT. Increased oxidation resistance of atherogenic plasma lipoproteins at high vitamin E levels in non-vitamin E supplemented men. *Atherosclerosis* 124: 83-94, 1996
 - 10) Packer L. Protective role of Vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 53: 1050S-1055S, 1991
 - 11) Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluo-rescent lipid peroxidation products in biological system and tissue. *Analytical Biochemistry* 52: 1-9, 1973
 - 12) Ching K. Chow. Nutritional influence on cellular antioxidant defense system. *Am J Clin Nutr* 32: 1066-1081, 1980
 - 13) Burton GW, Ingold KU. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569-573, 1984
 - 14) Nedyalka VY, Kurt A, Violeta GR. β -Carotene and lipid oxidation. *Fett/Lipid* 100(10): 444-462, 1998
 - 15) Helmut Sies, Wilhelm Stahl. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62(suppl): 1315S-1321S, 1995
 - 16) Lee BJ, Park JN, Lee SS. Effects of P/S ratios of dietary lipids and antioxidant vitamin supplements on the level of serum lipids and liver lipid peroxidation in rats treated with DMBA. *Korean J Nutr* 31: 906-913, 1998
 - 17) Lee WH, Chyun JH. Effect of β -carotene supplementation on lipid peroxide levels and antioxidative enzyme activities in diabetic rats. *Korean J Nutr* 36(7): 1-9, 2003
 - 18) John DB. Clinical laboratory methods, 9th revision, pp.552-553, Mosby, 1982
 - 19) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
 - 20) Dousset JC, Trouilh M, Foglietti MJ. Plasma malonaldehyde levels during myocardial infraction. *Clinica Chimica Acta* 129: 319-322, 1983
 - 21) Choi EJ. A study on lipid peroxides and glycosylated serum proteins in KK mice fed vitamin E supplemented diet. Master's Thesis, Graduate school, Seoul National University, 1994
 - 22) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972
 - 23) Aebi H. Catalase in vitro. *Method in Enzymology* 105: 121-126, 1984
 - 24) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth Enzymol* 52: 506-513, 1970
 - 25) Gary L, Peterson. Review of the Folin Phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100: 201-220, 1979
 - 26) Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Effect of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr* 60(6Suppl): 1017S-1022S, 1994
 - 27) Choi EJ. Effects of vitamin E on lipid composition and antioxidant defense system in rats fed high-fat diet. Master's Thesis, Graduate School, Sangji University, 1999
 - 28) Sung IS, Park EM, Lee MK, Han EK, Jang JY. Effect of acorn extracts on the antioxidative enzyme system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26(3): 494-500, 1997
 - 29) Hong SA, Wang SG. Effects of korean leek and dietary fat on plasma lipids and platelet aggregation in hypercholesterolemic rats. *Korean J Nutr* 33(4): 374-385, 2000
 - 30) O JH, Lee YS. Hypolipidemic effects of peptide fractions of casein on serum lipids in rats fed normal of high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(2): 263-270, 2002
 - 31) Kim CO, Kang SA. Effects of high fat and high carbohydrate diet on serum leptin and lipids concentration in rat. *Korean J Nutr* 34(2): 123-131, 2001
 - 32) Kang MJ. Effects of P/S ratio of fatty acids and antioxidants supplement on lipid metabolism in rats. Master's Thesis, Graduate School, Hanyang University, 2001
 - 33) Koh JB. The effects of cordyceps militaris on lipid metabolism, protein levels and enzyme activities in rats fed a high fat diet. *Korean J Nutr* 35(4): 414-420, 2002
 - 34) Choi EM, Park JR, Seo JS. Effect of β -carotene supplementation on lipid metabolism and related enzyme activities in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23(5): 743-749, 1994
 - 35) Willette WG, Pork BF, Underwood BA, Stampfer MJ, Pressel S, Rosner B, Taylor JO, Schneider K and Hames CG. Relation of serum vitamin A and E and carotenoids to the risk of cancer. *N Engl J Med* 310: 430-434, 1984
 - 36) Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abborr RD, Kalousdian S and Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study. *JAMA* 256: 2835-2845, 1986