

카페인 첨가가 흰쥐 간의 항산화 활성에 미치는 영향

성종환 · 장재철 · †장영상*

군산대학교 화학과, *중부대학교 식품생명공학과

The Effect of Caffeine on the Antioxidative Activities of Mouse Liver

Jong-Hwan Sung, Che-Chul Chang, and †Young-Sang Chang*

Department of Chemistry, Kunsan National University

**Department of Food Science & Biotechnology, Joongbu University*

Abstract

The purpose of this study was to examine the antioxidative activities and tissue cell of mouse liver added caffeine. The body weight of all experimental groups increased during experimental periods, but the body weight of caffeine-containing groups were lower than those of any other experimental groups. Superoxide dismutase and catalase activities tended to decrease significantly with caffeine-containing groups, but increased in control and ginseng-containing groups. Hydroperoxide contents were increase significantly with caffeine-containing groups. Lipid peroxidation levels decreased in ginseng-containing groups, but it increased significantly with caffeine-containing group. Protein contents were a tendency of similar between control and ginseng-containing groups, but it showed a increasing tendency in caffeine-containing groups. Microscopic observation of mouse liver cell were similar tissue in ginseng and caffeine-containing groups, but it showed somewhat more injuring only at the liver cell of anhydrous caffeine group, and became the suspicion in liver diseases. This results show that antioxidative activities are slightly higher in non-caffeine and ginseng-containing drinks than caffeine-containing drinks. From this standpoint, we suggest that too much drinking of caffeine-containing drinks for a long time is undesirable.

Key words : antioxidative activity, mouse liver, caffeine, superoxide dismutase, catalase.

서 론

최근 식문화의 발전과 경제수준이 높아짐에 따라서 다류, 음료류 등의 기호성 식품과 자양강장 및 피로 회복의 효과가 있는 드링크 제품들의 소비가 증가하고 있다. 이들 대부분 드링크 제품에 활성 비타민류 등의 영양소와 카페인 성분이 함유되어 있다.

카페인(1,3,7-trimethyl-xanthine)은 중추신경계와 말

초신경계를 자극하는 작용이 있어 적당량을 섭취하면 신경활동이 활발해지고 피로가 경감되는 효과가 있으나 과잉으로 섭취하면 중추신경계에 영향을 미쳐 신경과민, 흥분, 불면 등을 유발하고 위장, 소장, 결장, 내분비계에도 영향을 미친다^{1~3)}. 생체 내 필수적인 대사과정에서 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen(¹O₂)과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소 등이 생성되는데 이들 활성산소는 세

† Corresponding author : Young-Sang Chang, Dept. of Food Science & Biotechnology, Joongbu University, 101, Daehack-ro, Chubu-myon, Geum san-gun, Chung nam, 312-702, Korea.

Tel : +82-41-750-6728, Fax : +82-41-754-1292, E-mail : yschang@joongbu.ac.kr

포구성 성분들에 대하여 파괴작용을 나타냄으로 노화와 질병의 원인이 되기도 한다. 생체 내에는 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase(POD) 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화 물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다. 그러나 이와 같은 생체 방어 기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체 방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 야기된다^{3,4)}. 따라서 이와 같은 자유기를 소거할 수 있는 화합물 또는 과산화물 생성 억제물질과 같은 항산화 물질 및 이들의 생성을 촉진하고 자극할 수 있는 물질들에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있다.

한편, 커피나 카페인의 섭취와 지방대사와의 관련 연구에서 커피가 혈청의 지방농도에 영향을 주지 않는다는 보고⁵⁾가 있는 반면, 카페인은 혈청 유리지방산의 농도를 높이고 쥐의 사료에 카페인과 콜레스테롤을 첨가하였을 때 혈청 콜레스테롤, 혈청 인지질 등의 농도가 증가한다는 보고⁶⁾도 있다.

카페인의 효능 측면에서는, 스포츠에서 경기력을 향상시키는 기능, 중추신경계를 자극하여 정신을 맑게 하는 각성 효과, 소화 기관 위산 분비 촉진, 신장에서 이뇨작용 촉진, 호흡기 질환자의 호흡을 편하게 하는 기능이 있다⁷⁻⁹⁾. 그러나 임신중 카페인의 과다 섭취는 태아에 영향을 주며, 심장에 질환을 유발하고 무기질의 지나친 체외배설을 야기하며 위산의 과다 분비, Fe, Ca의 흡수에 영향을 준다는 보고도 있다¹⁰⁻¹²⁾.

홍삼성분, 비사포닌 성분인 페놀성 화합물 등이 활성산소에 대하여 유해작용을 나타내며, 흰쥐 조직의 경우 ginsenoside Rg1을 투여한 간장조직에서 항산화 활성화 인자인 SOD, catalase가 각각 30% 증가된다고 보고되어 있다¹³⁾. 항산화활성 면에서 산화적 대사를 하는 동안 생성되는 유해한 활성 산소들은 항산화 효소에 의해 제거되므로, 생체 내에서 방호 역할을 하는 내인성 항산화효소로 SOD¹⁴⁾와 CAT¹⁵⁾가 있는데, 카페인 성분이 함유된 드링크제를 먹인 생쥐의 간장 및 신장으로부터 항산화효소인 SOD와 catalase의 활성도를 측정하고 과산화 수소의 함량⁶⁾과 지질과산화의 함량⁴⁾ 등을 조사할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 카페인과 인삼성분을 함유한 자양강장 드링크 제품의 섭취가 마우스 간조직의 항산화 활성화인자인 SOD, CAT와 과산화 생성물인 hydroperoxide, 과산화 지질 및 간의 조직학적 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

실험동물은 평균체중 약 20 g 정도 되는 폐쇄군 ICR 계의 3주령 수컷 마우스 120마리를 중앙실험동물 회사로부터 공급 받아 사용하였다. 사육실은 실험동물사육의 적정 환경을 유지하였으며 사료는 삼양사료(주)에서 생산된 고품사료를 공급하여 사육하였다.

실험 A 군은 카페인, 인삼성분 및 당류가 함유되지 않은 순수한 물을 제공한 것을 대조군으로, 실험 B 군은 인삼성분 함유 드링크 제품을, 실험 C 군은 카페인과 인삼성분 함유 드링크 제품, 실험 D와 E 군은 카페인 함유 드링크 제품을 제공하였으며, 공히 카페인과 인삼성분 이외의 다른 성분들은 표기하지 아니하였다. F 군은 무수 카페인의 함량이 드링크제의 카페인 함량과 같은 30 mg/100 mL이 되도록 순수한 물에 녹여서 제공한 실험군이었다(Table 1).

2. 실험동물의 사육 및 시료 투여

마우스를 분양 후 1주일간 실험실 환경에 적응 사육시킨 후 수컷 20마리씩을 한 군으로 하여 6군으로 나누어 4주 동안 사육하였다. 사료는 2일 단위로 일정량을 투여하여 섭취량에 따른 체중을 측정하였다. 또한 시료투여는 음용수 병을 이용하여 자유롭게 음용케 하였으며 시료 이외의 다른 음용수는 투여하지 않았으며 매일 새로운 시료로 교환하였다.

마우스의 해부는 실험기간 28일이 지나면 시료의 투여를 중지하고 각 군당 수컷 다섯 마리씩 해부하여 간장 부위를 적출한 후 생리활성 변화를 측정하였다.

Table 1. The comparison of caffeine content and ginseng extracts in experimental groups

Experimental groups ¹⁾	Total Brix (°)	Caffeine (mg)	Ginseng extracts (mg)
A	0.0	-	-
B	14.3	-	204
C	14.3	30	450
D	12.8	30	-
E	19.0	30	-
F	0.0	30	-

¹⁾ A ; water, B ; ginseng-containing drink, C ; caffeine and ginseng-containing drink, D and E ; caffeine-containing drinks, F ; anhydrous caffeine.

3. Superoxide dismutase 활성도 측정

Flohe와 Otting의 방법¹⁷⁾에 의하여 측정하였다. 시험관에 50 mM potassium phosphate buffer (containing 0.1 mM EDTA, pH=7.8) 990 μ L, 증류수 17 μ L, 시료 17 μ L, 5 μ M xanthine 17 μ L를 넣은 후 17 μ L의 xanthine oxidase를 가한 다음 25°C, 550 nm에서 흡광도 증가속도를 측정하여 SOD 활성도를 구하였다. SOD 활성도는 위의 조건에서 cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

4. Catalase 활성도 측정

Catalase 활성도 측정은 Aebi 방법¹⁸⁾에 따라 측정하였다. 50 mM 인산 완충액(pH 7.0)으로 희석시킨 측정 시료 2.0 mL에 30 mM H₂O₂ 용액 1.0 mL를 넣은 후 20°C에서 파장 240 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μ mol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

5. Hydrogen Peroxide 함량 측정

Hydrogen peroxide 측정은 Wolff에 의한 방법¹⁹⁾을 사용하여 측정하였다. 100 μ M xylenol orange, 250 μ M ammonium ferrous sulfate, 100 mM sorbitol, 25 mM H₂SO₄가 되도록 각각을 합한 용액을 FOX I 시약으로 조제하고, 시료 50 μ L에 FOX I 시약 950 μ L를 혼합한 후, 실온에서 최소 30분 이상 방치한 다음, 원심분리하여 응결된 물질을 제거하고, 560 nm에서 분광광도계로 측정하였다.

6. 과산화 지질 수준의 측정

과산화지질 수준은 malondialdehyde(MDA)를 Ohkawa 방법²⁰⁾을 사용하여 thiobarbituric acid(TBA)법에 의해 측정하였다. 간 조직액의 10% 균질액 0.1 mL, 8.1% sodium dodecyl sulfate 용액 0.2 mL, 20% acetic acid 용액(pH 3.5) 1.5 mL와 0.8% TBA 용액 1.5 mL를 혼합하여 95°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 즉시 냉각시키고 n-butanol과 pyridine 혼합용액(15 : 1, v/v)을 가하여 격렬하게 흔든 다음 원심분리(4,000rpm, 10분)하여 얻은 상등액(유기층)의 흡광도를 532 nm에서 측정하며 표준 검량선을 얻기 위하여 1,1,3,3-tetramethoxy propane (TMP)을 표준품으로 사용하였다.

7. 단백질 함량 측정

단백질 함량은 Bradford 등의 방법²¹⁾을 이용하였다. 95% 에탄올 용액 50 mL에 coomassie brilliant blue G-250 100 mg을 녹인 다음, 85% 인산 100 mL을 가하

여 최종 부피가 1,000 mL가 되도록 한 용액 5 mL를 가하고 15분간 방치한 다음, 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

8. 간 조직학적 관찰

간 조직을 3~4 mm 두께로 손상이 안 가도록 잘라 조직 부피의 30~40배 분량의 pH 7.2~7.4의 10% neutral buffered formalin(40% formalin 100 mL, 증류수 900 mL, sodium phosphate monobasic 4.0 g, sodium phosphate dibasic anhydrous 6.5 g)에 즉시 넣어 고정시킨 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포맷한 다음 4 μ m 두께로 microtome 기구를 사용하여 박절, 각각 hematoxylin-eosin과 periodic acid-schiff 및 prussian blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다²²⁾.

9. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA 검증)을 수행하였으며, 군간의 상호유의성은 student's t-test²³⁾이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체중의 변화

각 실험군을 음용수로 마우스를 28일간 사육하는 동안의 체중의 변화는 Fig. 1과 같다. 즉, 실험 시작 시 수컷의 평균중량은 약 30.1g이었다. 모든 실험군들이 사육시간에 비례하여 28일에는 40.7g으로 일정하게 체중의 증가를 보였으며 그 증가율은 A군 35.68%, B군 33.39%, D군 32.69%, C군 31.93%, E군 31.90%, F군 31.46%의 순서로 나타났다. 시료 섭취량은 1일 평균 8 g 정도로써 실험 기간내 뚜렷한 증가나 차이를 보이지

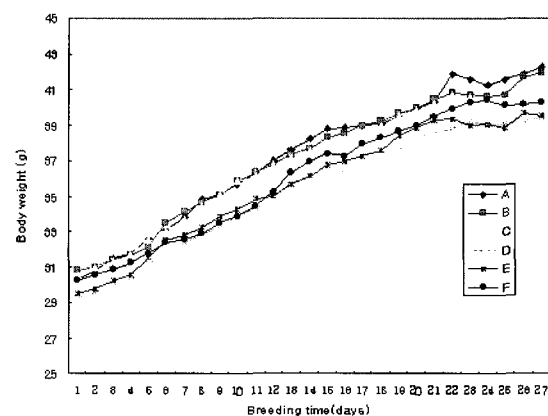


Fig. 1. The changes of body weight in mice. Groups ; See the legend of Table 1.

않았다.

따라서 카페인을 함유하지 않은 실험군(A, B)에서 체중이 다소 높게 증가하는 경향을 보였으며 카페인 함유 실험군(C, D, E, F)에서는 상대적으로 체중이 낮게 증가하는 경향을 나타내었다. 두 그룹간의 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가는 보이지 않았으나 Fears 등²⁴⁾의 커피나 카페인을 마시면 체중 감소에 영향이 있다는 보고와 대체로 일치하는 경향을 볼 수 있었다.

2. Superoxide Dismutase 활성

마우스에 각 실험군을 4주간 자의적으로 마시게 한 후 간 조직에서의 SOD 활성을 조사한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군(A)이 278.33±32.68 unit/mg protein이었으며, B군은 277.57±56.05(0.27%)으로 대조군과 비슷한 활성도를 보인 반면, C, D, E, F군은 각각 175.28±16.11(37.03%), 174.50±15.79(37.30%), 175.68±41.53(36.88%), 144.87±19.33(47.95%)으로 대조군에 비해서 감소하는 경향을 보였다. 각 실험군의 유의성을 조사한 결과 B군을 제외한 나머지 군에서 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다. SOD는 산소대사의 유해작용에 대한 가장 중요한 방어 효소의 하나로서 대사과정 중 생성되는 superoxide radical을 제거하기 때문에 생체내에서 SOD의 방어 기구는 중요한 역할을 할 것이다²⁵⁾. 본 실험에서 B군의 SOD 활성이 증가된 것은 시료성분 중에 인삼성분들로 인하여 생체 방어력이 증가한 것으로 여겨진다. Lankin 등²⁶⁾은 Tween 80과 함께 비타민 E를 마우스에 주사한 결과 SOD 활성이 증가되었다고 하였으며 카페인 + VE 첨가 시에도 SOD

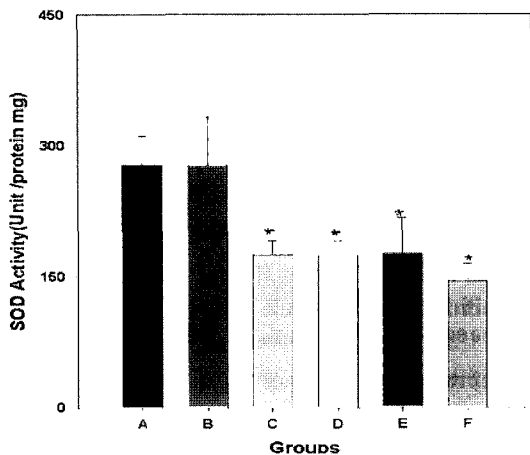


Fig. 2. The effects of superoxide dismutase activities in mouse liver.

* $p < 0.001$: Significantly different from control group. Groups ; See the legend of Table 1.

가 약간 증가한다는 보고가 있었다²⁷⁾.

3. Hydroperoxide 함량

마우스에 각 실험군을 4주간 자의적으로 마시게 한 후 간 조직에서의 과산화수소의 함량 변화를 조사한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군이 7.75±0.25 mM/g liver이었으며, B군은 7.85±0.32 (1.29%)으로 대조군과 비슷한 함량을 보인 반면에, C, D, E, F군은 각각 8.08±0.15(4.26%), 8.70±0.36(12.26%), 8.90±0.35 (14.83%), 8.65±0.21(11.61%)으로 대조군에 비해서 증가하는 경향을 보였다. 각 실험군의 유의성을 조사한 결과 B군을 제외한 나머지 군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있게 증가하였다. 커피나 카페인의 섭취와 지방대사와의 관련 연구에서 커피가 혈청의 지방농도에 영향을 주지 않는다는 보고⁵⁾와 카페인을 혈청 유리지방산의 농도를 높이고 쥐의 사료에 카페인과 콜레스테롤을 첨가하였을 때 혈청 콜레스테롤, 혈청 인지질 등의 농도가 증가한다는 보고⁶⁾도 있다. 따라서 연구 보고자에 의하여 과산화지질의 증가 또는 감소하는 경향이 각각 다르므로 보다 많은 연구 결과가 필요할 것이나 본 실험에서는 카페인 함유 실험군들이 간 조직에서 과산화수소의 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

4. Catalase 활성

SOD와 함께 중요한 활성산소 소거효소인 catalase 활성²⁵⁾의 변화를 마우스 간 조직에서 관찰한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군이 182.92±8.85 unit/mg protein이었으며, B군은 180.99±11.17(1.06%)으로

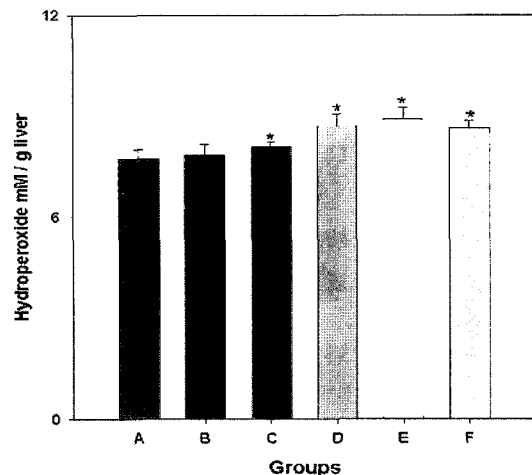


Fig. 3. The effects of hydroperoxide contents in mouse liver.

* $p < 0.001$: Significantly different from control group. Groups ; See the legend of Table 1.

대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 보인 반면에, C, D, E, F군은 각각 144.47 ± 14.18 (21.02%), 104.26 ± 13.68 (43.00%), 121.53 ± 22.49 (33.56%), 103.81 ± 9.94 (43.25%)으로 대조군에 비해서 감소하는 경향을 보였다. 각 실험군의 유의성을 조사한 결과 A, B군을 제외한 나머지 군에서 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다. 이러한 결과는 카페인 성분 첨가 식이의 시료군들은 catalase 활성이 감소하는 반면 카페인 없는 인삼성분 첨가 실험군의 항산화 활성도가 상대적으로 높음을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 흰쥐 간과 신장에서 카페인과 VE 식이가 SOD, CAT에 미치는 영향 등의 연구²⁵⁾결과와도 대체로 일치하는 경향이였다.

5. 과산화지질 수준

마우스 간 조직에서의 과산화지질 수준을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 대조군(A)이 198.63 ± 33.32 nmol/g liver이었으며, B과 C군은 각각 186.34 ± 29.97 (6.19%), 196.85 ± 29.94 (0.90%)으로 대조군에 비해서 감소하는 경향을 보인 반면에, D, E, F군은 각각 254.24 ± 10.19 (28.00%), 216.20 ± 13.88 (8.85%), 237.96 ± 21.75 (19.80%)으로 대조군에 비해서 증가하는 경향을 보였다. 각 실험군의 유의성을 조사한 결과 각각 D ($p < 0.001$), F($p < 0.01$)군에서만 유의성 있는 증가를 보였다. Fig. 5의 결과로 볼 때 카페인 섭취군은 과산화 지질의 함량이 상대적으로 다소 증가하는 경향을 보였으며 Park과 Cho²⁷⁾보고와도 대체로 일치하였다. 동일 카페인 함량 (30 mg) 수준에서도 시료군들 간의 유의성이 있는 것은 드링크 제품의 배합성분들의 상호

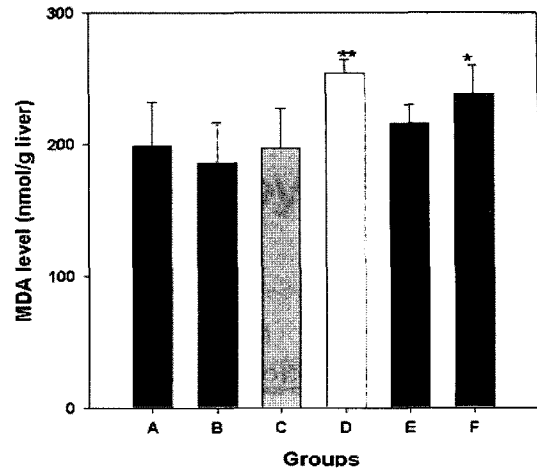


Fig. 5. The effects of MDA levels in mouse liver.

* $p < 0.01$: Significantly different from control group.

** $p < 0.001$: Significantly different from control group.

Groups ; See the legend of Table 1.

작용과 과산화지질 활성인자들²⁶⁾에 기인할 것으로 사료된다.

6. 단백질 함량 변화

Fig. 6에서 보는 바와 같이 마우스에 각 시료군 4주간 자유롭게 음용시킨 후 간 조직에서의 단백질 함량을 측정하였다. 대조군(A)이 70.58 ± 9.29 mg/g liver으로 B군 69.92 ± 8.55 (0.94%)와 비슷한 함량을 보인 반면에, C, D, E, F군은 각각 83.50 ± 12.29 (18.31%), 96.78 ± 8.73 (37.12%), 81.49 ± 19.31 (15.46%), 93.43 ± 23.18 (32.38%)

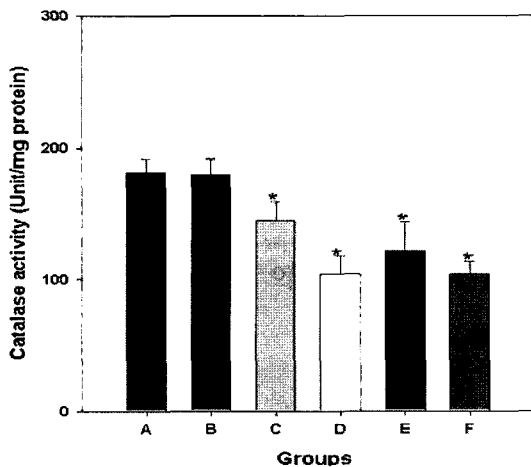


Fig. 4. The effects of catalase activities in mouse liver.

* $p < 0.01$: Significantly different from control group.

Groups ; See the legend of Table 1.

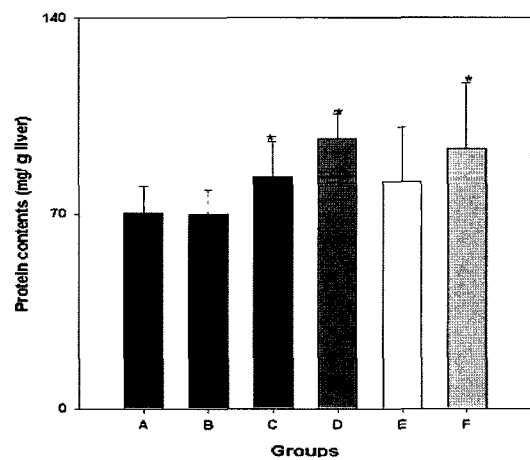


Fig. 6. The effects of protein contents in mouse liver.

* $p < 0.01$: Significantly different from control group.

Groups ; See the legend of Table 1.

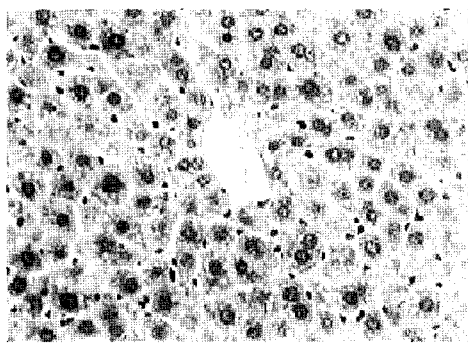
으로 대조군에 비해서 증가하는 경향을 보였다. 각 실험군의 유의성을 조사한 결과 C, D, F군에서만 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가를 보였다. 즉, 카페인이 첨가된 시료군(C, D, E, F)의 상대적인 단백질 함량이 높았으며 A, B군은 단백질 함량이 다소 낮은 결과를 보여주었다.

7. 간 조직학적 변화

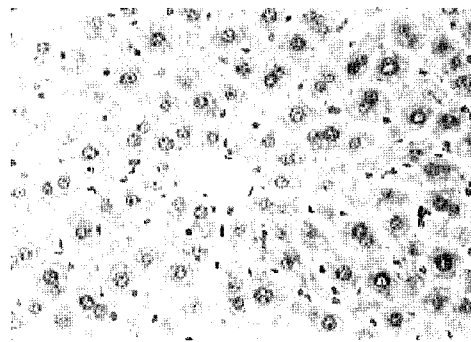
Fig. 7에서 카페인의 투여로 간의 조직학적 변화를 핵과 응모 수준에서 현미경으로 관찰한 결과를 나타

내었다. 대조군(A)에 비하여 B~E군은 간 조직에서 크나큰 차이를 보이지 않았으나 F군에서 간세포의 핵이 일부 파괴가 일어난 것으로 보아 간 질환에 의심이 가는 것으로 사료된다.

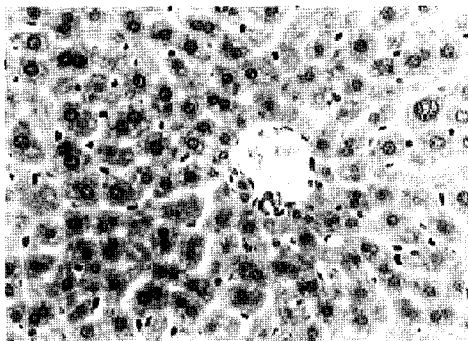
Bei 등²⁸⁾ 보고에서 지방수준을 달리한 식이에서 카페인의 첨가량에 따라서 흰쥐의 체내 지방대사에 간과 신장조직의 현미경적 조직관찰에 영향이 있었다. 따라서 드링크제품의 배합성분들로 인하여 간에서 조직학적, 병리학적 변화를 유발할 수 있는 수준의 카페인



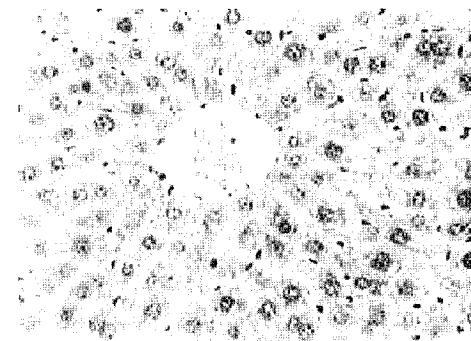
A Group



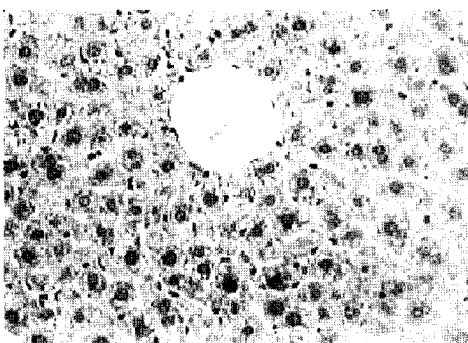
B Group



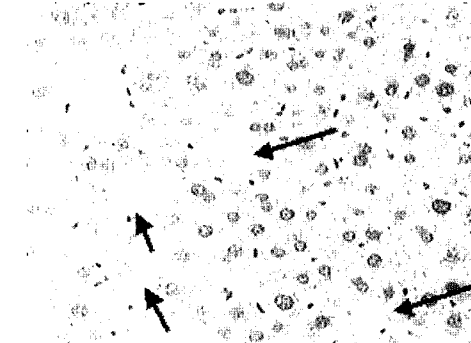
C Group



D Group



E Group



F Group

Fig. 7. Microscopic observation of liver cell in mice ($\times 1,000$).

Groups ; See the legend of Table 1.

함량을 함유하고 있다고는 할 수 없으나 F군에서만 간 세포의 손상이 관찰되므로 카페인 함유 드링크 제품들을 장기간 다량 복용할 시에는 특히 유의할 필요성이 있을 것이다.

결 론

마우스 간의 항산화 활성에 미치는 카페인 첨가의 영향을 연구하고자 카페인 및 인삼성분 함유 드링크 제품과 카페인 첨가 실험군으로 섭취시켜 4주간 사육한 후 마우스 간 조직의 항산화 활성 및 조직학적 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다.

체중은 모든 실험군에서 실험기간 동안 계속 증가하였으며, 특히 카페인함유 실험군이 다른 실험군에 비해 다소 낮은 체중 증가를 보였으나 유의적인 차이는 없었다. Superoxide dismutase 및 Catalase 활성은 카페인 함유 실험군에서 유의적으로 감소하였으며, 카페인을 함유하지 않은 실험군에서는 활성도가 높게 나타났다. Hydroperoxide 함량은 카페인을 함유한 모든 실험군에서 유의적으로 증가하는 경향이였다. 과산화 지질의 수준은 인삼성분 함유 실험군은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보인 반면, 카페인 함유 실험군에서는 유의성 있는 증가를 보였으나 다소 차이는 있었다. 단백질함량은 인삼성분 함유 군이 대조군과 비슷한 함량을 보인 반면에 카페인 함유 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다. 간 조직학적 변화는 인삼성분 및 카페인 함유 섭취군은 크나큰 조직적 차이를 보이지 않았다. 다만 무수카페인만은 음용수로 섭취한 실험군에서 간세포의 파괴가 다소 나타나 간질환에 의심이 되었다. 따라서 카페인을 함유하는 드링크 제품은 카페인을 첨가하지 않거나 인삼성분을 함유한 제품에 비하여 항산화 활성능력이 다소 감소하는 경향을 나타내었으며 장기간 다량 복용 시에는 간 조직에 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Tonychou, MD. Wake up and smell the coffee-caffeine, coffee and the medical consequences. *West. J. Med.* 157: 544-533. 1992
2. Regestein, QR. Pathologic sleepiness induced by caffeine. *Am. Med.* 588: 425-429. 1981
3. Goldsteine, A, Warren, R and Kaizer, S. Psychotropic effects of caffeine I. Individual difference in sensitivity of caffeine-induced wakefulness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 419:156-159. 1965
4. Rothore, N, John, S, Kale, M and Bhatnagar, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in los-proterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacological Research* 38(4) : 197-303. 1998
5. Callahan, MM, Rohovsk, MW, Robertson, RS and Yesair, DW. The effect of coffee consumption on plasma lipids, lipoproteins, and the development of aortic atherosclerosis in theses monkeys fed an atherogenic diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:834-548.1979
6. Thelle, DS, Arnesen, E and Forde, OH. The Tromso heart study. Does coffee raise serum cholesterol? *N. Engl. J. Med.* 308 :1454-1457. 1983
7. Lee, HW. A study on caffeine containing foods and the effect of caffeine in humans. *Culinary Research.* 6(3) : 343-355. 2000
8. Williams, MH. Nutritional ergogenic acids and athletic performance. *Nutrition Today* Jan/Feb.: 7-14. 1989
9. 대한영양사회. 임상영양관리지침서. 1994
10. Fenster, L, Eskenazi, B, Windham, GC and Swan, SH. Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. *Am. J. Pub. Health* 81 : 458-461. 1991
11. Lecos, CW and Caffeine Jitters. Some safety questions remain. *FDA Consumer Dec* : 22-27. 1987
12. Adatto, CB, MS, RD. Handbook of clinical dietetics. The American Dietetic Association, 1988
13. Song, BS, Rhee, MH, Park, HJ and Park, KH. Effects of ginsenoside Rg1 on drug-metabolizing system and antioxidant activities in rat tissues. *Proceeding of '95 Korea-Japan Ginseng symposium*: 32-34.1995
14. Ayako, OM and Irwin, F. Assay of superoxide dimutase cautions relevant to the use of cytochrome c, a sulfonated tetrazolium, and cyanide. *Analytical Biochemistry* 298:337-342. 2001
15. Yasuhisa, K and Irwin, F. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257(10):5751-5754. 1982
16. Craig, G, James, C and Janusz, MG. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry* 273:149-155. 1999
17. Flohe, L and Otting, F. Superoxide dismutase assays. *Methods in Ezymology* 105 : 93-105. 1984
18. Aebi, HE and Catalase. In : *Method of enzymatic analysis*. H. U. Bergmyer, ed. third edition. 3. Verlag. Chemi. Weinheim. : 273-286. 1982

19. Wolff, SP. Hydrogen peroxide assays. *Methods in Enzymology* 233:182. 1994
20. Ohkawa, H, Ohishi, N and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 95:351-358. 1979
21. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J. Anal. Biochem.* 72:248-254. 1976
22. Manual of histologic and special staining technology. 2nd ed. pp. 32-38. McGraw-Hill Book Co. New York. 1960
23. Scheffler, WC. Statistics for the biological sciences. Addison-Wesley. London. 1980
24. Fears, R. The hypercholesterolaemic effect of caffeine in rats fed on diets with and without supplementary cholesterol. *Br. J. Nutr.* 39:363-374. 1978
25. Klaus, J and Wolfgang, H. Development changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radical Biology & Medicine.* 20(4): 613-617. 1996
26. Lankin, VZ, Tikhaze, AK, Rakita, DR, Pomoinetskii, VD and Vikhert, AM. Effect of *α*-tocopherol on superoxide dismutase and glutathione lipoperoxidase activities of mouse liver cytosol. *Biokhimiya, Moscow.* 48:1555. 1983
27. Park, ML and Cho, SY. Effects of dietary vitamin E level and caffeine on lipid peroxidation in rat liver. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(4): 561-567. 1994
28. Bei, HS, Lee, SK and Ahn, HS. Effect of caffeine on lipid metabolism in the rat fed with different levels of dietary lipids. *J. Basic Science, Sungshin Women's Univ.* 4: 1-11. 1987

(2004년 12월 6일 접수)