

쥐의 대두 단백질 섭취가 국소 뇌허혈/재관류 후 뇌경색 크기와 항산화효소 활성도에 미치는 영향

이희주

상지대학교 보건과학대학 간호학과 전임강사

Effect of Dietary Soybean Protein on Cerebral Infarction Size and Antioxidant Enzyme Activities in Rat Focal Brain Ischemia Model

Hee Joo Lee

Full-time Instructor, Department of Nursing, College of Health Science, Sangji University, Wonju, Korea

Purpose: The purpose of this study was to investigate the cerebral infarction size, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation changes after 6 weeks of dietary soybean protein intake in a rat focal brain ischemia model. **Method:** Weaning Sprague-Dawley rats were fed with either modified AIN-93G diet containing casein 20% (control), 20% soybean protein isolate-based diet (S20), or 40% of soybean protein isolate-based diet (S40) for 6 weeks. The animals were subject to right middle cerebral artery occlusion for 2 hr. After 24 hr of recirculation, the rats were sacrificed. Antioxidant enzymes activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) level in the right brain were also measured. **Result:** There were no significant differences in the right cortical infarction volume, TBARS level, SOD and CAT activities among the three groups whereas the GPx activities of the S20 group were significantly higher than those of the control group ($p=.02$). **Conclusion:** Our results suggest that 20% of soybean protein may have a modulating effect on GPx and possibly have some protective effect against oxidative stress although it may enough to decrease cerebral infarction volume in rat focal brain ischemia model.

Key Words : Soybean protein; Cerebral infarction; TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance); SOD (Superoxide dismutase); GPx (Glutathione peroxidase)

국문주요어 : 대두 단백질, 뇌경색, TBARS, SOD, GPx

서 론

1. 연구의 필요성

우리나라에도 최근 허혈에 의한 뇌졸중 발생이 증가하여

Corresponding author :

Hee Joo Lee, Full-time Instructor, Department of Nursing, College of Health Science, Sangji University, 660 Woosan-dong, Wonju 220-702, Korea
Tel: 82-33-738-7632 Fax: 82-33-738-7652
E-mail: foremost@sangji.ac.kr

*본 연구는 2003년도 기초간호과학회의 학술 지원을 받아 행해졌음.

*본 연구는 2005학년도 서울대학교 박사학위 논문의 일부분임.

*This study was supported by the Korean Biological Nursing Science in 2003.

*This study was a part of doctoral dissertation from Seoul National University in 2005.

그에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(Chan, 2001; Choi-Kwon et al., 2004). 뇌허혈 후 산소 재관류(reperfusion) 시 발생하는 반응성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 과산화물 라디칼(superoxide anion, O_2^-), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 수산기 이온(hydroxyl radical, OH) 등으로 구성되어 있으며(Chan, 2001), ROS는 세포막의 지질 과산화(lipid peroxidation) 반응을 유발하여 조직 손상을 초래하고(Davis & Goldberg, 1987), 단백질을 산화(protein peroxidation)시킬 뿐 아니라 직접적으로 DNA 및 RNA에 치명적인 영향을 미쳐 뇌손상을 가속화시키는 것으로 밝혀졌다(MacManus, Buchan, Hill, Rasquinha, &

Preston, 1993; Chan, 2001). 따라서 ROS는 신경손상과 뇌 기능 장애를 유발하는 것으로 알려져(Chan, 2001) 뇌경색 발생의 중요한 요인으로 보고되었다(Kinouchi et al., 1991).

ROS에 의한 손상을 줄여 생체를 보호하는 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등이 있으며, 비효소계로 ROS 제거 역할을 하는 glutathione (GSH)이 있다(Borrello et al., 1984; Chan, 2001). 뇌조직의 특징은 체내 다른 조직에 비해 지방조직이 많으나 ROS와 지질 과산화물을 제거할 수 있는 SOD, CAT, GPx 등의 항산화 효소 활성도와 GSH 함량이 상대적으로 낮고 산소 소모량이 많아, 뇌허혈 후 재관류 시 빠른 ROS 증가를 보이며, 산화적 손상과 허혈에 매우 취약하다(Chan, 2001).

현재 ROS에 의한 산화적 손상을 억제시키는 성분들에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며 밝혀진 유효성분 대부분은 채소나 과일에 다량 함유되어 있고, 주로 항산화 작용과 면역 증강 등의 생리적 활성을 나타내, 만성 질병을 예방하거나 질병을 지연시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다(Sauvaget, Nagano, Allen, & Kodama, 2003; Xu, Harris, Wang, Murphy, & Hendrich, 1995). 그 중 대두는 고단백질과 고지방을 함유하여 영양학적으로 매우 우수한 식품으로 최근 연구를 통해 항산화 효과 및 면역성 강화 등 새로운 기능이 보고되면서 대두 단백질과 대두에 포함된 기타 생리활성물질에 대한 관심이 집중되고 있다(Rimbach et al., 2003). 대두 단백질은 동맥경화와 고지혈증을 줄이고(Anthony, Clarkson, & Williams, 1998), LDL 콜레스테롤의 산화를 감소시키는 항산화 효과가 있어 고혈압과 뇌졸중의 발생을 줄이는 것으로 알려져 있다(Riikka, Timo, Jani, Riitta, & Heikki, 2000).

또한 대두 단백질 섭취 시, 간에서 Cu/Zn-SOD 활성도와 GPx 활성도를 증가시키는 항산화 효과가 있는 것으로 보고되었으며(Song, Igawa, & Horri, 1996; Aoki, Otaka, Igarashi, & Takenaka, 2002), 혈중 지질 과산화 생성을 감소시키고(Madani, Prost, & Belleville, 2000), 지질 과산화 형성 지표가 되는 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)를 낮춰 지질 과산화물 축적을 감소시켰으며, 결국 산화적 스트레스를 낮추는 것으로 보고되었다(Sekizaki, Yokosawa, Chinen, Adachi, & Yamane, 1993). 이 외에도 대두 단백질 섭취는 뇌조직에서 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde (MDA)를 낮추고(Madani et al., 2000) 뇌의 국소적 허혈 후 산화물(conjugated diene) 형성을 지연시키는 것으로 보고되

었다(Castiglioni et al., 2003). 또한 Madani 등(2000)은 casein과 대두 단백질 섭취량에 따른 혈중 TBARS 농도 변화를 비교한 결과, casein 10% (결핍량), 20% (정량), 30% (과량)는 대두 단백질 10%, 20%, 30%에 비해 TBARS 축적이 유의하게 높아 단백질 급원에 상관없이 단백질 농도가 감소함에 따라 TBARS 축적이 증가하며, 과량(30%)의 대두 단백질은 지질 과산화 감소를 유도하는 것으로 보고하였다(Madani et al., 2000). 따라서 과량의 대두 단백질 섭취는 ROS와 지질과산화물 생성으로 인한 체내 산화적 손상에 대하여 지질 과산화물 축적을 줄일 수 있어 뇌손상 보호 효과를 기대할 수 있다.

이러한 대두 단백질의 기능을 볼 때 대두 단백질 식이는 뇌조직에서 ROS와 지질 과산화물 생성을 줄여 항산화 효과가 있을 것으로 기대되지만, 뇌조직의 항산화 효소 활성도에 미치는 영향에 관한 연구는 상당히 미비한 실정이다. 따라서 한국인의 식생활에서 많이 섭취되는 대두 단백질 20%와 40%가 뇌허혈 후 재관류 시, 뇌손상 크기와 항산화 효소 활성도에 미치는 영향을 조사할 필요가 있다.

2. 연구 목적

본 연구의 목적은 6주간 Sprague-Dawley 수컷 쥐의 대두 단백질 섭취가 뇌허혈/재관류 후 뇌경색 크기, 지질과산화물 축적 및 항산화 효소 활성도에 미치는 영향을 규명하는 것이다.

구체적인 연구 목적은 다음과 같다.

- 1) 대두 단백질 섭취가 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 뇌경색 크기에 미치는 영향을 규명한다.
- 2) 대두 단백질 섭취가 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 지질 과산화물(TBARS) 축적에 미치는 영향을 규명한다.
- 3) 대두 단백질 섭취가 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 항산화효소인 SOD, CAT 및 GPx 활성도에 미치는 영향을 규명한다.

3. 용어 정의

1) 뇌허혈

본 연구에서는 쥐의 오른쪽 경부를 절개하여 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내외 경동맥의 분지점에서 내경동맥 내로 probe를 삽입하는 우측 중뇌동맥 폐쇄 방법을 이용하였으며(Focal cerebral ischemia model, Nagasawa & Kogure, 1989) 이 방법으로 우측 중뇌동맥으로 가는 혈류를 2시간 동안 차단하여 뇌허혈을 일으키는 것을 의미한다.

2) 재관류

본 연구에서는 Nagasawa와 Kogure (1989)의 중뇌동맥 폐쇄 방법에 따라 쥐의 내경동맥에 probe를 삽입하여, 우측 중뇌동맥으로 가는 혈류를 2시간 동안 차단한 후, probe를 제거하여 24시간 동안 재관류시킨 것을 의미한다.

3) 뇌경색 크기

본 연구에서는 Nagasawa와 Kogure (1989)의 중뇌동맥 폐쇄 방법에 따라 쥐의 우측 중뇌동맥의 폐쇄 및 재관류를 시행해 뇌경색이 유발된 쥐를 희생시켜 뇌를 적출하였고, 전두엽 기점으로 처음 1 mm 이후부터 2 mm 두께로 연속 절편하였다. 이 절편된 조각들의 각 면적(mm²)과 각 slice 두께(2 mm)를 곱한 용적(mm³)의 총 합을 의미한다(Korea Food & Drug Administration, 1999).

연구 방법

1. 연구 설계

본 연구는 무작위 대조군 전후 설계를 이용한 순수 실험연구이다. Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대조군, S20군 그리고, S40군의 3개 군으로 나누어 6주간 각 군에 해당되는 식이를 섭취시킨 후 뇌허혈/재관류 후 각 군의 뇌경색의 크기, 지질 과산화물 축적 및 항산화 효소의 활성도를 비교하였다.

2. 실험대상 및 방법

1) 실험동물 및 식이

(1) 실험동물

실험동물은 생후 4주령 Sprague-Dawley 수컷 쥐(Dae-han Experimental Animal Co., Eumseong-gun, Korea)로, 무병동물 즉 Specific Pathogen Free (SPF) 상태로 90마리를 반입하여 대조군과 S20군 그리고 S40군에 각각 30마리씩, 하나의 cage당 총 3마리씩 무작위로 할당하였다. 각 군에 해당되는 식이를 제공하여 6주간 사육하였고, 식이 섭취량은 2-3일, 체중은 1주일에 한 번씩 측정하였다. 국소적 뇌허혈 모델을 이용한 뇌허혈 유발 수술 시 몸무게는 290-320 g이었다. 뇌허혈 유발 수술 후 대조군에서 2마리, S20군에서 2마리 그리고 S40군에서 4마리 등 총 8마리가 재관류 24시간 이전에 사망하였고, 수술 후 뇌조직을 확인해 본 결과 대조군에서 6마리, S20군에서 4마리, S40군에서 9마리 등 총 19마리에서 뇌경색이 일부 유발되었거나 전혀 유발이 되지 않아,

전체 27마리를 제외한 총 63마리가 실험대상이 되었다. 63마리 중 뇌경색 크기 측정은 대조군 10마리, S20군 10마리 그리고 S40군 7마리, TBARS 측정은 대조군 6마리, S20군 7마리 그리고 S40군 5마리, 항산화 효소 활성도 측정은 대조군 6마리, S20군 7마리 그리고 S40군 5마리가 배정되었다.

(2) 실험 환경

사육실의 환경은 온도는 20±2°C, 습도는 50±5%, 조명은 12시간 간격으로(7:00-19:00) 밝음과 어두움을 조절하였다. 그 외 환기, 조명, 소음 등을 조절하였으며, 실험쥐와 실험 환경을 제어하는 모든 사항은 국제 실험동물 관리 공인협회 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal, AAALAC)에서 제시하는 국제적인 기준에 준하여 이루어졌다. 사육실과 실험실 환경 모니터링, 실험동물 관리(식이제공), 뇌허혈 유발을 위한 수술, 회복과정 및 재료 채취는 임상실험실의 기준을 지침으로 관리되었다(Laboratory for Experimental Animal Research, 2000).

(3) 식이

이유가 끝난 4주령부터 6주 동안 대조군은 casein 단백질 20%, S20군은 대두 단백질 20% 그리고 S40군은 대두 단백질 40%를 섭취시켰다. 대조군과 S20군 및 S40군의 식이는 필수성분을 포함하여 제작된 AIN 93G (American Institute of Nutrition, Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993)를 이용하였으며 구성 성분은 Table 1과 같다. AIN-93G는 성장기(Growth)의 실험쥐를 위한 기본 식이로 본 연구에서 대조군 식이(control diet)로 이용하였다. 대조군의 단백질 급원인 casein은 S20군과 S40군에서 대두 단백질로 대체되었고, S40군에는 S20군에 비해 증가된 20%의 단백질 비율 대신 옥수수 전분에서 20%를 감소시켰으며, 또한 성장기 실험쥐에서 메티오닌 부족 예방을 위해 대두 단백질에서 소량 함유된 메티오닌을 첨가하여 제공하였다(식이의 각 성분은 미국의 Sigma와 ICN에서 수입하여 제작하였다). 그리고 모든 식이는 제작 후 방사선 멸균 처리를 한 후 제공하였으며, 음수는 autoclaved 또는 purified 상태로 자유로이 섭취하도록 하였고, 식이 공급은 분말형태로 제공되었으므로 식이 손실을 막는 먹이통을 이용하였다.

2) 중뇌동맥 폐쇄(MCA occlusion)를 이용한 국소적 뇌허혈 모델
4주령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 6주간 사육한 후,

Nagasawa와 Kogure (1989)에 의한 우측 중뇌동맥 폐쇄 방법으로 국소 뇌허혈 모델(Focal cerebral ischemia model, Nagasawa & Kogure, 1989)을 이용하여 뇌허혈을 유발하였다. 30% O₂와 70% N₂O에 enflurane (1.5%)을 추가한 혼합가스를 이용하여 흡입 마취를 시킨 후, 목의 정중선을 따라 경부를 절개하여 우측 총경동맥(common carotid artery, CCA), 내경동맥(internal carotid artery, ICA), 외경동맥(external carotid artery, ECA)을 분리하였다. 총경동맥과 외경동맥을 절찰하고 내외 경동맥의 분지점에서 위쪽으로 미세하게 절개를 한 후, 내경동맥 내로 1.7 cm의 probe를 삽입하여 우측 중뇌동맥으로 가는 혈류를 차단하였다. 수술 2시간 후 중뇌동맥에서 probe를 제거하여 24시간 재관류시킨 다음 희생시켜 즉시 뇌를 적출하였다. 뇌허혈 모델을 유발하는 동안 보온패드를 이용하여 직장 체온을 37±0.5°C로 유지하였다.

3. 자료 수집 절차 및 방법

1) 우측 대뇌피질 뇌경색 크기 측정

Nagasawa와 Kogure (1989)에 의한 우측 중뇌동맥 폐쇄 방법에 따라 뇌허혈을 유발시킨 쥐를 희생시켜 1분 내에 뇌를 적출하였다. Brain slicer에 적출한 뇌를 올려놓고, 전두엽을 기점으로 처음 1 mm 절편 조각은 실험에 이용하지 않고, 그 다음부터 2 mm 두께로 연속적으로 절편하여 총 7조각을 만든 다음 2% 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에서 실온에 60분간 담가서 염색하였다(Bederson et al., 1986). 2% TTC 염색 후 10% phosphate-buffered formalin 용액에 고정시킨 후 24시간 내에 각 절편의 표면 영상을 CCD video camera로 촬영하여, 영상 분석 장치(image analyzer Ver, 2.0)를 이용해 뇌경색의 면적을 측정하였다.

2) 지질과산화물(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 함량 측정

MDA는 지질과산화로 생기는 물질 중에 가장 많은 aldehyde로 TBA와 반응해서 분홍색을 띤 생성물 즉 TBARS를 측정하였다. 우측 대뇌피질의 균질화용액 또는 분획물에서 0.1-0.2 mg/ml의 단백질을 함유한 시료에 TCA-TBA-HCl (15%, w/v, trichloroacetic acid: 0.375%, w/v, thiobarbituric acid: 0.25N hydrochloric acid)을 넣은 후 끓는 수조에서 10분간 가열하였다. 가열 후 상온으로 식으면, 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리시킨 후 상층만 분리하여 535 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다(Buege &

Aust, 1978).

3) 항산화 효소 활성도 측정

(1) 시료의 수집 및 전 처리

실험쥐에서 뇌를 적출하여 식염수로 혈액을 씻어내고, 조직 일부를 떼어내어 뇌경색 유무를 확인한 후 뇌경색이 확인된 경우 뇌조직을 균질용 완충용액과 섞어 균질화한 후 원심분리기로 분획하여 상층의 맑은 용액만 채취하였다. 분획한 것을 몇 개의 에펜도르프 튜브에 나누어 담아 액체질소로 급속 냉동시킨 후 분석할 때까지 -70°C에 보관하였다.

(2) 항산화 효소 활성도 측정

① SOD 활성도

대뇌 피질을 좌우로 분리한 후 우측 대뇌피질을 균질화한 용액을 1,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 세포질 용액과 미토콘드리아를 분리했다. 세포질인 부유층을 추출해 30°C에서 0.05 M NaHCO₃-Na₂CO₃ buffer (pH 10.2, 10⁻⁴M EDTA 함유) 2.9 ml을 3 ml cuvet에 넣고, 0.01N HCl에 녹인 10⁻²M DL-epinephrine을 0.1 ml을 넣은 후, 480 nm에서 분당 흡광도 차이가 0.025 이상이 되도록 상태를 맞춘 후 Buffer 대신 적당히 희석한 시료 2.9 ml에 0.1 ml의 epinephrine을 넣은 후 3분간 흡광도를 측정하여 1분당 값을 취하였다(Misura & Pridovich, 1972).

② CAT 활성도

CAT 활성도는 우측 대뇌 피질을 균질화한 용액을 1,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포질 용액과 미토콘드리아를 분리하였다. 부유층인 세포질 용액을 phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)로 2 ml가 되게 희석한 다음 30 mM H₂O₂ 1 ml을 첨가한 후 빨리 vortex로 mix한 다음 30초간 spectrophotometer를 이용하여 240 nm에서 흡광도를 측정하였다(Aebi, 1984).

③ GPx 활성도

GPx 활성도는 우측 대뇌피질의 균질액의 1,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 세포질 용액과 미토콘드리아를 분리한 후 12,500×g, 4°C에서 30분간 원심 분리하여 부유층인 세포질 용액에서 cumene hydroperoxide를 기질로 사용하여 측정하였다. Reduced form of glutathione (GSH)는 GPx에 의해 oxidised form of glutathione (GSSG)로 산화되는데,

이것이 다시 Glutathione Reductase (GR)와 NADPH에 의해 GSH로 환원될 때, NADPH가 NADP+로 산화되는 정도를 340 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다(Tappel, 1978).

④ 단백질 함량

항산화 효소 측정값은, 단백질 함량(mg protein)단위로 계산되므로 단백질 함량을 측정하였다.

단백질 농도는 5-100 µg/ml 정도로 희석한 시료에 1 ml의 solution A (0.5%, w/v, CuSO₄·5H₂O: 1%, w/v, sodium citrate)와 50 ml의 solution B (2%, w/v, Na₂CO₃: 0.4%, w/v, NaOH)를 즉시 섞은 용액 2.5 ml를 가하고, 잘 섞은 후 실온에 5-10분간 방치한 후, 증류수로 1:1 희석한 Folin-

Ciocalteu phenol reagent 0.25 ml를 가하여 잘 섞었다. 20-30분 후에 750 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였는데, 소혈청 알부민(bovine serum albumin)을 표준용액으로 사용하여 단백질 함량을 계산하였다(Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

4. 자료 분석 방법

각 자료는 SPSS WIN 11.0 통계 program을 이용하여 분석하였다. 각 군의 체중, 뇌경색 크기, 지질과산화물 축적 및 항산화 효소 활성도는 평균과 표준편차로 나타났다. 뇌경색 크기 지질과산화물 축적 및 항산화 효소 활성도의 세 그룹 간 비교는 ANOVA로 분석한 후 사후 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다. 모든 통계적 유의수준은 p<0.05에서 채택하였다.

Table 1. Experimental diet composition

Ingredient	Grams/kg		
	Control*	S20	S40
Casein	200	-	-
Soy protein	-	200	400
Corn starch	627	627	427
Cellulose	50	50	50
Soybean oil	70	70	70
Vit. mix ¹	10	10	10
Salt mix ²	40	40	40
DL-methionine	3	3	3

S20: 20% soy protein diet, S40: 40% soy protein diet.
 *: Modified AIN 93G purified rodent diet; ¹: Nutritional biochemicals, ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio. Vitamin mixture is composed of; Vit. A Acetate (500,000 IU/g) 1.8 g, Vit. D₂ (850,000 IU/g) 0.125 g, DL-α-Tocopherol (250 IU/g) 22.0 g, Ascorbic acid 45.0 g, Inositol 5.9 g, Choline chloride 75.0 g, Menadione 2.25 g, p-Aminobenzoic acid 5.0 g, Niacin 4.25 g, Riboflavin 1.0 g, Pyridoxine hydrochloride 1.0 g, Calcium pantothenate 3.0 g, Biotin 0.02 g, Folic acid 0.09 g, Vit. B₁₂ 0.00135 g and Dextrose to 1 kg; ²: Composition of salt mixture, g/kg mixture; calcium phosphate dibasic 500 g, sodium chloride 74 g, Potassium sulfate 52 g, Potassium citrate monohydrate 220 g, Magnesium oxide 24 g, Manganase carbonate (43-48% Mn), 3.5 g, Ferric citrate (16-17% Fe) 6.0 g, Zinc carbonate 1.6 g, Cupric carbonate (53-55% Cu) 0.3 g, Potassium iodate 0.01 g, Chromium potassium sulfate 0.55 g, Sodiumselenite 0.11 g, Sucrose, finely powdered 118.0 g.

연구 결과

1. 체중변화와 식이 섭취량

각 군 간의 동질성 확보를 위해 4주령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대조군, S20군 그리고 S40군에 각각 무작위로 배정하였다. 이때 체중은 대조군은 100.5±10.0 g, S20군은 97.9±8.5 g 그리고 S40군은 100.4±8.3 g으로 대조군과 실험군 간에 유의한 차이가 없었으며(F=.782, p=.461), 6주간의 식이 섭취 후 체중은 대조군은 314.6±11.9 g, S20군은 299.5±13.5 g 그리고 S40군은 305.1±10.3 g으로 S20군과 S40군이 대조군에 비해 체중이 유의하게 적었다(F=12.072, p=.000). 또한 본 연구의 실험기간 동안 실험쥐의 식이 섭취량은 Table 2에서 보는 바와 같이 한 마리당 6주 동안 평균 하루 섭취량이 대조군은 14.9±0.4 g, S20군은 14.5±0.6 g 그리고 S40군은 15.0±0.5 g으로 대조군과 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(F=2.444, p=.106) (Table 2).

Table 2. Body weight & daily diet intake in the control, S20 and S40 groups

Homogeneity		Control (n=30) (m±SD)	S20 (n=30) (m±SD)	S40 (n=30) (m±SD)	F	p
Body weight	At the beginning of the experiments (g)	100.5±10.0	97.9±8.5	100.4±8.3	.782	.461
	At the time of occlusion (g)	314.6±11.9	299.5±13.5*	305.1±10.3 [†]	12.072	.000 [‡]
Diet intake	Average daily diet intake for 6 weeks (g)	14.9±0.4	14.5±0.6	15.0±0.5	2.444	.106

Data are mean± standard deviation. S20: 20% soy protein diet; S40: 40% soy protein diet.
 *: Significant between S20 & Control; [†]: Significant between S40 & Control; [‡]: p<.05.

Table 3. Right cortical infarction volume in the control, S20 and S40 groups

Group	Infarction volume (mm ³) (m±SD)	F	p
Control (n=10)	196.7±102.8	.681	.516
S20 (n=10)	257.0±97.1		
S40 (n=7)	237.3±158.3		

Data are mean±standard deviation.

S20: 20% soy protein diet; S40: 40% soy protein diet.

Table 4. TBARS levels of right cerebral cortex in the control, S20 and S40 groups

Group	TBARS (nmol/mg protein) (m±SD)	F	p
Control (n=6)	0.19±0.04	2.966	.082
S20 (n=7)	0.16±0.02		
S40 (n=5)	0.21±0.04		

Data are mean±standard deviation.

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; S20: 20% soy protein diet; S40: 40% soy protein diet.

2. 뇌경색 크기

뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 뇌경색 크기는 대조군은 196.7±102.8 mm³, S20군은 257.0±97.1 mm³ 그리고 S40군은 237.3±158.3 mm³으로 대조군과 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(F=.681, p=.516) (Table 3).

3. 지질과산화물 측정

뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 지질과산화물 측정은 대조군은 0.19±0.04 nmol/mg protein, S20군은 0.16±0.02 nmol/mg protein 그리고 S40군은 0.21±0.04 nmol/mg으로 대조군과 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(F=2.966, p=.082) (Table 4).

4. 항산화효소 활성도

뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 SOD 활성도는 대조군은 29.89±7.26 unit/mg protein, S20군은 37.89±11.13 unit/mg protein 그리고 S40군은 29.30±13.05 unit/mg protein으로 대조군과 실험군 간에 유의한 차이가 없었으며 (F=1.304, p=.300), CAT 활성도는 대조군은 3.75±0.63 unit/mg protein, S20군은 3.44±0.95 unit/mg protein 그리고 S40군은 3.86±0.93 unit/mg protein으로 대조군과 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(F=.383, p=.688). 한편, 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 GPx 활성도는 대조군은

Table 5. SOD, CAT and GPx activity of right cerebral cortex in the Control, S20 and S40 groups

Group	SOD activity (unit/mg protein) (m±SD)	CAT activity (unit/mg protein) (m±SD)	GPx activity (unit/mg protein) (m±SD)
Control (n=6, 6, 6)	29.89±7.26	3.75±0.63	0.028±0.006
S20 (n=7, 6, 7)	37.89±11.13	3.44±0.95	0.040±0.005*
S40 (n=5, 5, 5)	29.30±13.05	3.86±0.93	0.035±0.009
F	1.304	.383	5.146
p	.300	.688	.020 ¹

Data are mean±standard deviation.

SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; S20: 20% soy protein diet; S40: 40% soy protein diet.

*: Significant between S20 & control; ¹: p<.05.

0.028±0.006 unit/mg protein, S20군은 0.040±0.005 unit/mg protein 그리고 S40군은 0.035±0.009 unit/mg protein이었다. S20군의 GPx 활성도는 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다(F=5.146, p=.020) (Table 5).

논 의

본 연구는 6주간 대조군, S20군 및 S40군에 각각의 식이를 공급하여 각 군의 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 뇌경색 크기, 지질 과산화물 측정 그리고 항산화 효소 활성도 등을 측정하여 대두 단백질 식이가 뇌허혈/재관류 후 뇌손상에 미치는 영향을 규명하였다. 그 결과를 토대로 다음과 같이 논의하고자 한다.

뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 뇌경색 크기는 대조군과 실험군 그리고 S20군과 S40군 간에 유의한 차이가 없었다. 대두 단백질 섭취 시 뇌경색 크기 감소 효과와 뇌 내 항산화 효소 활성도에 미치는 효과에 대해 보고된 바 없어 선행 연구와의 직접적인 비교가 어려우나, 대두 단백질 섭취가 간에서 Cu/Zn-SOD 활성도와 산화적 손상이 있을 때 GPx 활성도를 증가시키며(Aoki et al., 2002; Song et al., 1996), LDL 콜레스테롤의 산화를 감소시켜 혈중 TBARS 측정을 감소시키는 항산화 효과가 있어(Riikka et al., 2000) 뇌허혈/재관류 후 뇌경색 크기를 감소시킬 수 있을 것으로 생각하였다. 그러나 GPx 활성도가 증가될 때 뇌경색 크기가 감소된 선행 연구(Choi-Kwon et al., 2004)와 반대로 본 연구에서 대두 단백질 섭취 후 뇌경색 크기가 감소되지 않은 이유는 GPx 활성도를 증가시키기는 하였지만 뇌경색 크기를 감소시킬만한 수준이 아닌 것으로 생각된다. 또는 SOD나 CAT 활성도에는 영향을 미치지 않았기 때문인 것으로 생각할 수 있

다. 한편 뇌는 낮은 CAT 활성도로 GPx 역할의 중요성이 강조되는데, 실제 항산화 효소 활성도와 단백질 수준에는 차이가 있으므로 이에 대해 뇌조직 내 항산화 효소의 단백질 수준과 apoptosis 상태를 직접 측정하는 생리적 또는 병리적 지표를 확인하는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한편, 본 연구 결과 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 TBARS 축적은 대조군과 실험군 그리고 S20군과 S40군 간에 유의한 차이가 없었다. 대두 단백질 섭취 시 casein 단백질 섭취에 비해 뇌의 국소적 허혈 후 conjugated diene 형성이 지연되고(Castiglioni et al., 2003) 혈중 TBARS 축적을 감소(Aoki et al., 2002; Madani et al., 2000)시킨 선행 연구 결과를 살펴보면 섭취하는 단백질의 종류에 따라 TBARS 축적이 차이가 있음을 알 수 있다. 그러나 뇌허혈 후 90일간 식이를 섭취한 선행 연구(Castiglioni et al., 2003)와 본 연구는 식이 적용기간과 시기가 달라 비교에 제한점이 있으나, 본 연구 결과와는 상반된다. 이러한 결과는 대두 단백질 섭취가 TBARS 축적을 감소시킬 수 있는 항산화 효소 활성을 유도하지 못한 것 때문으로 생각된다. 또는 어유에 풍부한 docosa-hexaenoic acid (DHA)와 eicosapentaenoic acid (EPA)는 산화적 손상 시 그 자체가 항산화제 역할을 하여 라디칼을 형성하지 않으면서 ROS로부터 뇌세포막의 인지질 산화를 감소시켜서 뇌 조직의 지질과산화 축적을 감소시키고(Choi-Kwon et al., 2004) 뇌경색 크기를 감소시키는 것으로 알려졌다. 그러나 대두 단백질은 그러한 작용을 하지 못한 것으로 생각할 수 있다.

한편, 대두 단백질 섭취(11%) 시 섭취하지 않은 경우에 비해 뇌 내 지질과산화 최종 산물인 MDA를 낮추고, 대두 단백질 또는 casein 단백질을 20% 또는 30%로 섭취시켰을 경우 단백질 비율이 높을수록 혈중 TBARS 축적이 유의하게 감소하는 것으로 보고되어(Madani et al., 2000) 단백질의 종류에 상관없이 단백질의 양에 따라 TBARS 축적이 매우 다를 수 있음을 알 수 있다. 그러나 위의 선행 연구 결과와 상반되게 본 연구에서는 대두 단백질의 양에 따른 TBARS 축적은 유의한 차이가 없었다. 이러한 연구 결과의 차이는 GPx 활성도가 대두 단백질의 양에 따라 유의한 차이가 없는 것과 같은 맥락으로 생각할 수 있다. 또는 SOD, CAT 및 GPx 활성도에 유의한 변화가 없었기 때문으로도 생각할 수 있다. 따라서 뇌 허혈/재관류 후 항산화 효소 즉 SOD, CAT 및 GPx 활성도가 모두 증가해야 TBARS 축적을 억제할 수 있으며 이것이 뇌경색 크기를 줄이는데 영향을 미칠 것으로 생각된다.

또한 본 연구 결과 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 GPx 활성도는 S20군은 대조군에 비해 유의하게 높았으며($p = .020$), S40군은 대조군에 비해 높았지만 유의하지 않았다. 항산화 효소 중 GPx는 SOD에 의해 분해된 H_2O_2 를 무독한 물과 산소로 분해하고 ROS와 지질과산화물을 제거하여, 세포의 산화적 손상으로부터 조직을 보호하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Chan, 2001). S20군에서 대조군에 비해 우측 대뇌피질의 GPx 활성도가 유의하게 높은 것은 대두 단백질 섭취가 산화적 손상이 있을 때 간에서 GPx 활성도를 증가시켰다는 선행 연구 결과(Song et al., 1996)와 유사하다. 이는 대두 단백질이 casein 단백질에 비해 시스테인 함량이 2배 이상 높은(Hagemester, Scholz-Ahrens, Schulte-Coerne, & Barth, 1990) 아미노산 조성과 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉 시스테인은 GSH의 구성 성분이며, GSH의 존형 효소인 GPx 활성도는 시스테인 함량이 더 많은 대두 단백질 섭취 시 증가되는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 대두 단백질 섭취는 뇌허혈/재관류 후 GPx 활성도를 유의하게 높일 수 있을 것으로 생각된다.

그러나 대두 단백질 20%와 40%의 섭취량에 따른 GPx 활성도 변화는 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 아마도 단백질의 체내 이용률과 관계가 있을 수도 있다. 대두 단백질은 미네랄 및 섬유질과 같은 기타 구성 성분들과 서로 작용하여 단백질의 생체 이용률을 감소시킬 수도 있고, 생체의 소화능력이 casein은 83.56%, 대두 단백질은 76.11%로 차이가 있어(Carias, Cioccia, & Hevia, 1995), 단백질의 종류에 따라 생체 이용률 즉 체내 단백질 효율은 영향을 받을 것으로 생각된다. 체내 필요한 단백질량은 정확히 알 수 없으나, 정량 이상의 단백질이 공급될 때 여분의 단백질에 대해서는 생체 효율이 떨어져 S20군과 S40군 사이에는 GPx 즉 항산화 효소 활성도와 체중에 차이가 없는 것으로 생각된다. 따라서 개체의 단백질 생체 효율에 따른 변화를 감안하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 또한 대두 단백질은 섭취하는 개체에 따라 장 점막의 흡수 능력이 달라 식이 섭취 후 효과에 차이가 있음이 보고된 바 있어(Xu et al., 1995), 본 연구에서는 Sprague-Dawley의 대두 단백질의 체내 장 점막 흡수 능력이 떨어졌을 가능성도 배제할 수 없다.

한편, 우측 대뇌피질의 SOD와 CAT 활성도는 대조군과 실험군 그리고 S20군과 S40군 간에 유의한 차이가 없었다. Cu/Zn-SOD와 CAT의 활성도가 유의하게 높을 때 뇌경색 크기를 줄여(Kinouchi et al., 1991) 뇌허혈/재관류 후 SOD

활성도가 뇌경색 크기 감소에 중요한 역할을 하는 것으로 가정할 수 있다. 그러나 본 연구 결과 대두 단백질 섭취 시 SOD와 CAT의 활성도가 증가하지 않은 것은 다음과 같이 생각해 볼 수 있다. 먼저 장기에 따른 특성에 차이가 있을 것으로 생각된다. 간의 단백질 교체(turnover)는 5-6일 정도이며, 골격근은 약 50일 정도 되는 것으로 보고되었다(Ji, Dillon, & Wu, 1990). 따라서 간에서 단백질 섭취로 인한 조직의 변화는 섭취기간이 짧아도 단백질 교체 기간이 짧아 항산화 효소 활성도를 증가시킬 것으로 생각된다(Aoki et al., 2002; Song et al., 1996). 그러나 뇌조직은 다른 기관에 비해 인지질을 다량 함유하고 있어 단백질이 차지하고 있는 비율이 상대적으로 낮다. 뇌조직의 단백질 turnover 기간이 어느 정도인지 또는 뇌조직 내 구성되어 있는 단백질이 식이로 인하여 어느 정도가 turnover 되는지에 대해 보고된 바 없어 정확히 알 수 없으나, 뇌조직 내 단백질의 turnover는 상대적으로 다른 조직에 비해 더 늦어질 것으로 생각된다. 따라서 뇌허혈 후 90일간의 대두 단백질 식이 섭취로 지질 과산화물 축적이 유의하게 감소한 선행 연구(Castiglioni et al., 2003)도 있어, 식이 적용 기간을 6주 이상의 장기간을 고려해 볼 수 있다. 그러나 본 연구에서 쥐의 식이 섭취 기간은 성장기 6주(4주령-10주령)로 국소적 뇌허혈 모델을 적용 시 쥐의 체중이 280-300g (Nagasawa & Kogure, 1989)일 때 뇌혈관의 굵기가 적당하기 때문에, 쥐의 이유가 끝난 직후 식이 적용이 가능한 시점인 4주령부터 식이를 제공하여 뇌허혈 유발 수술 시 적당한 몸무게 유지를 위해 성장기를 이용할 수밖에 없었던 점이 있다.

또한 섭취하는 단백질과 관련이 있는 것으로 생각된다. 대두 단백질은 casein 단백질에 비해 필수 아미노산의 농도와 메티오닌 함량이 낮다(Madani et al., 2000). 따라서 필수 아미노산의 상대적 부족이 쥐의 성장기 체내 항산화 효소 활성도에 어떠한 영향을 미쳤는지 알 수 없다. 이러한 결과는 S20군과 S40군에서 대조군에 비해 체중 증가가 유의하게 적은 것과 관련 있는 것으로 보이며, 선행 연구와 유사한 결과로 대두 단백질에서의 필수아미노산인 라이신(lysine)과 메티오닌의 결핍에 의한 것으로 보인다(Madani et al., 2000). 또한 생체의 여러 가지 조건에 따라 영양소 흡수가 변화할 수도 있어 성장 발달단계에 따라 섭취하는 단백질의 종류와 질에 대한 고려가 필요할 것으로 생각된다.

한편, 앞서 언급한 바와 같이 대두에는 단백질 이외에도 여러 가지 구성 성분이 있는데, 그 중 식물성 생리활성물질

(phytochemical)로 항산화 효과를 가진 것으로 알려진 isoflavone에 대한 관심이 높아지고 있다(Riikka et al., 2000). Isoflavone은 항산화 효소 중 특히 GPx 활성도를 강화하고, 지질과산화 형성과 TBARS를 감소시키는 것으로 보고되었다(Anderson, Diwadkar, & Bridges, 1998). 또한 isoflavone 보충 식이가 혈장, 간, 뇌 조직 등에서 ROS 수준을 떨어뜨려 ROS 제거 역할에 주되게 관여하는 것으로 알려졌다(Rimbach et al., 2003). 따라서 대두 단백질의 0.05% 정도(Wang & Murphy, 1994a) 함유된 isoflavone보다는 고용량의 isoflavone을 식이에 첨가해 섭취할 경우, ROS 제거와 항산화 효과 역할을 하여 뇌경색 크기 감소에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그러므로 적절한 isoflavone 보충 식이를 적용해 뇌경색 크기에 미치는 영향을 규명할 수 있는 추가 연구를 제안한다.

결론 및 제언

본 연구는 쥐의 대두 단백질 식이 섭취가 뇌허혈/재관류 후 뇌경색 크기, 지질과산화물 축적 및 항산화 효소 활성도에 미치는 영향을 규명하고자 시행한 무작위 대조군 전후 설계를 이용한 순수실험연구이다. 실험대상으로 생후 4주령 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대조군, S20군 그리고 S40군에 각각 30 마리씩 무작위로 할당된 후 각(casein 20% [대조군], 대두 단백질 20% [실험1군, S20] 및 대두 단백질 40% [실험2군, S40]) 그룹에 해당된 식이로 6주간 사육시킨 후, 10주령에 Nagasawa와 Kogure (1989)에 의한 중뇌동맥 폐쇄 방법 즉 국소적 뇌허혈 모델을 적용하였다. 내경동맥 내로 probe를 삽입 후 우측 중뇌동맥으로 가는 혈류를 2시간 차단한 후, probe를 제거해 24시간 동안 재관류시킨 후 희생시켜 즉시 뇌를 적출하였다.

전두엽 기점으로 처음 1 mm 이후부터 2 mm 두께로 연속적으로 절편한 7조각을 염색, 고정시켜 24시간 내에 촬영한 후 영상 분석 장치(image analyzer Ver. 2.0)로 대뇌피질 뇌경색 면적(mm²)과 용적(mm³)을 계산하였다. 지질과산화물은 대뇌피질을 원심 분리시킨 후 상층만 분리하여 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였고 항산화 효소 활성도는 세포질 용액에서 CAT 활성도와 SOD 활성도를, 미토콘드리아를 분리해 낸 세포질에서 GPx 활성도를 측정하였다.

뇌경색 크기 지질과산화물 축적 및 항산화 효소 활성도의 세 그룹 간 비교는 ANOVA로 분석한 후 사후 검정은 Dun-

can's multiple range test를 이용하여 분석하였다. 모든 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 채택하였다.

연구 결과는 다음과 같다.

1) 6주간 대두 단백질 20%와 40% 식이 섭취 후 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질 뇌경색 크기는 대조군과 실험군, 그리고 S20군과 S40군 사이에 유의한 차이가 없었다.

2) 6주간 대두 단백질 20%와 40% 식이 섭취 후 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 TBARS는 대조군과 실험군, 그리고 S20군과 S40군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3) 6주간 대두 단백질 20%와 40% 식이 섭취 후 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 SOD 및 CAT 활성도는 대조군과 실험군, 그리고 S20군과 S40군 사이에 유의한 차이가 없었다.

4) 6주간 대두 단백질 20% 식이 섭취 후 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 GPx 활성도는 S20군이 대조군에 비해 유의하게 높았다($p=0.02$).

이상의 연구 결과는 6주간의 대두 단백질 20% 섭취가 대조군에 비해 뇌허혈/재관류 후 우측 대뇌피질의 항산화 효소인 GPx 활성도를 유의하게 증가시켰으나, TBARS에는 영향을 미치지 않았으며, 뇌경색 크기 감소에 유의한 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

이상의 연구 결과를 토대로 다음과 같이 제언하고자 한다.

1) 본 연구 결과 대두 단백질 식이는 뇌허혈/재관류 후 산화적 손상 시 GPx 활성도를 높이는 것으로 생각된다. 따라서 weston blot를 이용하여 SOD, CAT 및 GPx 등의 항산화 효소의 단백질 양 측정과 세포의 괴사 상태를 직접 측정하는 추후 연구를 제언한다.

2) 대두 단백질에 포함되어 있는 isoflavone은 체내 항산화 효과에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있어 뇌경색 크기 감소에 영향을 미칠 것으로 기대된다. 따라서 대두 단백질 식이 보다는 고용량 isoflavone을 식이에 첨가하여 이것이 뇌경색 크기에 미치는 영향을 규명하는 추후 실험 연구를 제언한다.

참고문헌

- Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro. Methods Enzymol*, 105, 121-126.
- Anderson, J. W., Diwadkar, V. A., & Bridges, S. R. (1998). Selective effects of different antioxidants on oxidation of lipoproteins from rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 218(4), 376-381.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., & Williams, J. K. (1998). Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanism. *Ame J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), 1390-1393S.
- Aoki, H., Otaka, Y., Igarashi, K., & Takenaka, A. (2002). Soy Protein Reduces Paraquat-induced oxidative stress in rats. *J Nutr*, 132(8), 2258-2262.
- Borrello, S., Seccia, A., Galeotti, T., Bartoli, G. M., Farallo, E., & Serri, F. (1984). Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Archi Dermatol Res*, 276(5), 338-340.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
- Carias, D., Cioccia, A. M., & Hevia, P. (1995). Agreement between animal and vegetable protein digestibility measured in vivo and in vitro and its effect on the chemical score. *Arch Latinoam Nutr*, 45(2), 111-116.
- Castiglioni, S., Manzoni, C., D'Uva, A., Spiezie, R., Monteggia, E., Chiesa, G., Sirtori, C. R., & Lovati, M. R. (2003). Soy proteins reduce progression of a focal lesion and lipoprotein oxidizability in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *Athero*, 171(2), 163-170.
- Chan, P. H. (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(1), 2-14.
- Choi-Kwon, S., Park, K. A., Lee, H. J., Park, M. S., Lee, J. H., Jeon, S. E., Choe, M. A., & Park, K. C. (2004). Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res Dev Brain Res*, 152(1), 11-18.
- Davies, K. J., & Goldberg, A. L. (1987). Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem*, 262(17), 8227-8234.
- Hagermeister, H., Scholz-Ahrens, K. E., Schulte-Coerne, H., & Barth, C. A. (1990). Plasma amino acids and cholesterol following consumption of dietary casein or soy protein in minipigs. *J Nutr*, 120(11), 1305-1311.
- Ji, L. L., Dillon, D., & Wu, E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*, 258 (4 Pt 2), R918-R923.
- Kinouchi, H., Epstein, C. J., Mizui, T., Carlson, E., Chen, S. F., & Chan, P. H. (1991). Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(24), 11158-11162.
- Korea Food & Drug Administration. (1999). Studies on the animal models of ischemic brain damage for the screening of neuroprotective agents. *Ministry Health Welfare*, 64-118.
- Laboratory for Experimental Animal Research. (2000). Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. T. (1951). Protein measurement with the foline phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- MacManus, J. P., Buchan, A. M., Hill, I. E., Rasquinha, I., & Preston, E. (1993). Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett*, 164(1-2), 89-92.
- Madani, S., Prost, J., & Belleville, J. (2000). Dietary protein level and

- origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defence status in the rat. *Nutrition*, 16(5), 368-375.
- Misura, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247(10), 3170-3175.
- Nagasawa, H., & Kogure, K. (1989). Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 20(8), 1037-1043.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123(11), 1939-1951.
- Riikka, N., Timo, V., Jani, V., Riitta, K., & Heikki, V. (2000). Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci*, 66(2), 115-124.
- Rimbach, G., De Pascual-Teresa, S., Ewins, B. A., Matsugo, S., Uchida, Y., Minihane, A. M., Turner, R., VafeiAdou, K., & Weinberg, P. D. (2003). Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica*, 33(9), 913-25.
- Sauvaget, C., Nagano, J., Allen, N., & Kodama, K. (2003). Vegetable and fruit intake and stroke mortality in the Hiroshima/Nagasaki life span study. *Stroke*, 34(10), 2355-2360.
- Sekizaki, H., Yokosawa, R., Chinen, C., Adachi, H., & Yamane, Y. (1993). Studies on zoospore attracting activity. II. Synthesis of isoflavones and their attracting activity to *Aphanomyces euteiches* zoospore. *Biol Pharm Bull*, 16(7), 698-701.
- Song, Y., Igawa, S., & Horri, A. (1996). Antioxidant enzymes response to endurance exercise training and dietary proteins in rat skeletal muscle and liver. *Appl Human Sci*, 15(5), 219-225.
- Tapple, A. L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol*, 52, 506-513.
- Wang, H., & Murphy, P. A. (1994a). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effect of variety, crop year and location. *J Agricul Food Chemi*, 42, 1674-1681.
- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr*, 125(9), 2307-2315.