

## Mouse hepatoma 세포를 이용한 농산부산물로부터 quinone reductase활성물질의 탐색

김정상 · 남영중\* · 김주원

인제대학교 식품영양학과, \*한국식품개발연구원

### Screening of Quinone Reductase Inducers from Agricultural Byproducts Using Mouse Hepatoma Cell Line

Jong-Sang Kim, Young Jung Nam\* and Joo-Won Kim

Department of Food Science and Nutrition, Inje University

\*Korea Food Research Institute

#### Abstract

The induction of phase II enzymes including quinone reductase [NAD(P)H dehydrogenase(quinone); NAD(P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase, EC 1.6.99.2] is a major mechanism of whereby a large group of heterogeneous compounds prevent the toxic, mutagenic, and neoplastic effects of carcinogen. Using murine hepatoma cells(Hepa1c1c7 cells), quinone reductase(QR) inducers as the possible chemopreventive agents were screened from rice bran, wheat bran, soymilk residue, defatted soybean cake, defatted sesame and perilla residues. The 80% methanol extracts of defatted sesame and perilla residues induced quinone reductase significantly while the others did have little effect on the enzyme induction. Thin layer chromatography of the extracts showed that the fastest moving band(Rf=0.70) in the developing solvent of n-butanol : n-propanol : 2N ammonia(10 : 60 : 30) was responsible for the enzyme induction by the 80% methanol extracts of defatted sesame and perilla residues. Further identification of active component(s) is in progress.

Key words: quinone reductase, perilla, sesame, chemopreventive agents

#### 서 론

식품성분가운데는 발암과정을 억제하는 소위 항암물질들이 많은 연구에서 보고되어 왔다<sup>(1-3)</sup>. 식물기원의 암예방효과가 있을 것으로 추정되고 있는 성분으로는 carotenoids, vitamin C, vitamin E, selenium, 식이섬유, dithiolthiones, isothiocyanates, indole 화합물, phenol류, protease 저해제, allium화합물, 식물성 sterol, limonene 등이 있다. 이들은 다시 작용기작에 따라 blocking agent(차단제)와 suppressing agent(억제제)로 구분할 수 있는데 terpenes, indoles,  $\beta$ -carotene, phenols, allium 화합물 등이 전자의 계열에 속한다면, protease 저해제, epigallocatechin gallate<sup>(4)</sup>, nerolidol 등의 화합물은 이미 발암물질에 노출된 세포가 악성종양으로 진행되는 과정을 저지한다고 할수 있다<sup>(3-5)</sup>.

일반적으로 항종양활성유무의 평가는 장기간의 실험을 요하는 동물실험을 통하여 이뤄져 왔으며 이러한 시간적

제약이 항암물질의 신속한 검색에 장애로 여겨져 왔다. 그런데 최근 지금까지 알려진 많은 항암물질들이 생체외 이물질(xenobiotics)의 대사에 관여하는 2상효소계(Phase II enzyme)를 활성화시킨다는 것이 입증됨에 따라, 항암물질의 신속한 검색이 가능하게 되었다<sup>(6-9)</sup>. 즉, 2상 효소계를 활성화시키는 물질이 곧 항암성분으로 작용할 가능성이 높기 때문에 일차적으로 이 물질들에 대한 검색이 이뤄진 후 동물실험으로 항암효과를 확인하는 순서로 연구를 진행한다면 기존의 방법보다 훨씬 효율적인 항암물질의 개발이 기대된다. 항주혈충증제로 사용되고 있는 oltipraz는 ICR/Ha 생쥐를 대상으로 한 실험에서 benzo(a)pyrene 이나 aflatoxins에 의해서 유도되는 발암과정을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났는데 그 방어기작이 제2상효소계의 활성화와 밀접한 관련이 있는 것이 보고되어 있다<sup>(10-11)</sup>. 지금까지 알려진 제2상효소계의 작용기작은 반응성이 강한 발암성분으로 하여금 세포내 분자들과 반응하는 것을 억제한다는 것이다. Prochaska 등은<sup>(7,8)</sup> mouse hepatoma cell line을 이용하여 신속하게 제2상효소계 활성을 측정하는 시스템을 개발하였으며, 이를 이용하여 broccoli로부터 항암성분으로 sulphoraphane을 분리, 동정하는데 성공하였다<sup>(12)</sup>.

Corresponding author: Jong-Sang Kim, Department of Food Science and Nutrition, Inje University, 607 Obang-dong Kimhae, Kyongnam 621-749, Korea

본 연구에서는 미강 등 국내에서 생산되는 대표적인 농산부산물 6종을 대상으로 2상효소계를 활성화시키는 성분들을 탐색하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용한 시료로서 미강, 밀기울은 한국식품개발연구원으로부터 그리고 참깨박, 들깨박은 (주)동신 제약으로부터 구입하였으며, 탈지대두박과 두유박은 각각 (주)동방유광과 (주)정식품에서 공급을 받았다. 각 시료로부터 물추출물과 메탄올 추출물을 제조하기 위하여 시료 무게의 10배량의 물 또는 80% 메탄올수용액을 첨가하여, 상온에서 12시간 교반하면서 추출하고, 여과하였다. 잔사에 다시 10배량의 용매를 가하고 3시간씩 2회 추출한 후 추출물을 모아 45°C 이하에서 감압농축하고 최종적으로 동결건조하여 -80°C에 보관하면서 공시하였다. *tert*-butylhydroquinone(t-BHQ),  $\beta$ -naphthoflavone( $\beta$ -NF)은 Aldrich(St. Louis, MO)로부터, 2,4-dichlorophenolindophenol(DCPIP)과 benzo(a)pyrene은 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)와 alpha-modified minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)은 Gibco BRL(NY, USA)로부터 구입하였다.

### 세포독성의 측정

Hepal1c7세포(mouse hepatoma cell)를 10% fetal bovine serum(heat and charcoal treated, FBS)를 함유하는 alpha-minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)배지에서 배양하였다. 세포는 1회용 세포배양 plate(100 mm, Corning)에서 monolayer로 자라도록 하였으며, 배양온도 및 CO<sub>2</sub>농도는 37°C, 5%로 유지하였다.

시료추출물의 세포독성(cytotoxicity)을 측정하기 위하여 세포배양 plate에 세포를  $3 \times 10^4$  cells/mL 농도로 분주하고, 4시간 배양 후 여기에 일정농도의 시료추출액을 가한 다음, 무처리구가 confluency에 도달하였을 때(보통 분주 후 3일) 세포의 상태를 현미경으로 관찰하고, 세포를 trypsin-EDTA용액으로 처리한 다음, 일정량의 세포배양액에 현탁시키고 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다.

### Quinone reductase 활성 측정

Hepal1c7세포를 10% FBS과 penicillin( $10^5$  units/L), streptomycin(100 mg/L)를 함유하는  $\alpha$ -MEM 배지에서 배양하였다. 세포를 세포배양 plate(100 mm)에  $3 \times 10^4$ /mL 농도로 분주하고 48시간 배양한 다음, 추출용매에 용해시킨 동결건조 시료를 0.5 mg/mL 농도로 첨가하여 24시간 더 배양하였다. 배양이 완료되면 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 5 mL씩 3회 반복하여 씻었다. Plate에 0.25 M sucrose 용액 1 mL를 가하고, cell scraper를 이용하여 세포를 수집하고, ultrasonic cell

disrupter(50W, Kontes)에서 세포를 균질화하였다. 세포 균질액(cell extract)을 microfuge에서 원심분리(5000×g, 10분)한 후 QR효소활성과 단백질함량 측정에 사용하였다. QR 효소활성은 Benson 등의 방법<sup>13)</sup>에 따라, 2-dichlorophenolindophenol(DCPIP)를 환원시키는 정도를 측정하여 나타냈다. 즉, 반응액 3 mL에 25 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.7 mg BSA, 0.01% Tween 20, 5  $\mu$ M FAD, 0.2 mM NADH, 0 또는 10  $\mu$ M dicumarol, 0.2 mL 세포균질액을 혼합하여 제조하였다. 여기에 40  $\mu$ M DCPIP를 첨가함으로써 반응을 시작하고 600 nm에서 2분동안 scanning을 수행하였다. QR효소활성은 1분간 감소되는 흡광도와 DCPIP의 molar extinction coefficient ( $2.1 \times 10^4$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)로부터 환원된 DCPIP의 양을 계산하고 세포 균질액의 단백질함량을 측정하여 nmoles DCPIP reduced/min/mg protein으로 나타내었다. 한편 단백질함량은 Lowry법<sup>14)</sup>으로 측정하였다.

### Arylhydrocarbon hydroxylase(AHH) 효소활성 측정

AHH는 Nebert<sup>15)</sup>의 방법에 따라, benzo(a)pyrene을 기질로 하여 측정하였다. 세포배양은 QR효소활성 측정시와 같은 조건하에서 수행하였으며, 1회 측정에 약  $5 \times 10^6$  cells를 사용하였다. 2개의 plate(100 mm)에 가득 자란 세포를 0.15M KCl-10 mM potassium phosphate 완충 용액(pH 7.25)으로 씻은 후, 같은 용액 1 mL를 가하여 cell scraper로 세포를 수집하고 ultrasonic cell disrupter에서 균질하여 세포균질액을 제조하였다. 0.2 mL 세포균질액과 0.76 mL 반응액을 혼합하여 37°C에서 3분간 예열하고 기질로서 40  $\mu$ g 2 mM benzo(a)pyrene을 가하여 60분간 반응시켰다. 즉, 최종효소반응액 1 mL에는 50  $\mu$ mol potassium phosphate buffer(pH 7.25), 0.39  $\mu$ mol NADH, 0.36  $\mu$ mol NADPH, 0.2 mL cell extract, 80 nmol benzo(a)pyrene(in 40  $\mu$ g methanol)이 함유되도록 하였다. 반응을 종결하기 위하여 4.25 mL cold hexane-acetone (3.25 : 1)를 가하고 37°C에서 10분간 반응산물을 추출하였다. 유기용매층 1 mL와 1.0N NaOH 3 mL를 혼합한 다음, 1000×g에서 2분간 원심분리하고, 즉시 알카리층을 취하여 형광광도계(SFM-25, Kontron)에서 형광광도를 측정(Ex 398 nm, Em 522 nm)하여 상대적인 효소활성을 계산하였다.

### 추출물의 Thin layer chromatography

분석용 또는 preparative TLC plate(Kieselgel 60 F 254, Merck)에 시료 각각 5  $\mu$ 씩 점적하든가 또는 100  $\mu$ 씩(preparative TLC) band 형태로 spotting하여 n-butanol : n-propanol : 2N ammonia(10 : 60 : 30)을 전개용매로 하여 14 cm 전개시켰다. 전개가 종료된 후 자외선(short UV light: 254 nm)하에서 분리된 점적 또는 띠를 확인하여 표시하였다. Preparative TLC plate에서 전개한 시료는 Rf값에 따라 각 분획을 razor blade로 채취하여 80% 메탄올로 추출하고, 원심분리 및 여과를 거쳐 공

**Table 1. Cytotoxicity of water and 80% methanol extracts**

item(s)	water extract (mg/ml)		80% methanol extract (mg/ml)	
	1.25	2.5	1.25	0.5
rice bran	-	-	+++	++
wheat bran	-	-	+	-
soymilk residue	-	-	-	-
defatted soybean cake	-	-	-	-
defatted sesame residue	-	-	++	+
defatted perilla residue	-	-	++	+

+++ : less than 10% cell survival, ++ : less than 50% cell survival, + : less than 80% cell survival, - : not cytotoxic

시하였다.

**결과 및 고찰**

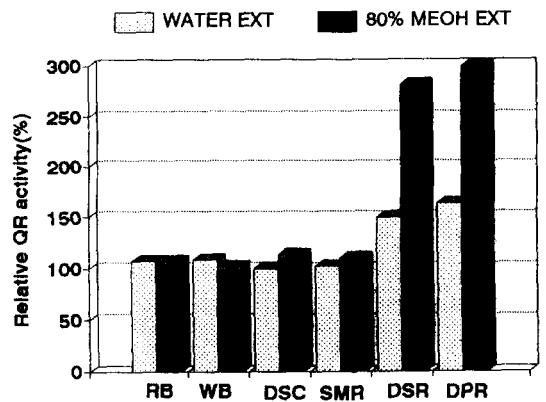
**세포독성**

Hepal1c7 세포를 대상으로 각시료의 추출물을 세포 분주 직후 세포배양액에 일정농도로 첨가하여 3일간 배양한 다음, 세포독성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 전반적으로 80%메탄올 추출물이 세포독성이 강하게 나타난 반면 물추출물은 본 실험에서 사용한 최대농도인 2.5 mg/ml에서도 세포독성이 관찰되지 않았다. 시료종류별로는 미강의 80%메탄올추출물이 가장 강한 세포독성을 나타냈으며, 들깨박과 참깨박도 상당한 세포독성을 보였다. 밀기울은 약한 세포독성을 나타냈으며, 탈지대두박과 두유박의 80% 메탄올 추출물은 사용한 최대농도인 1.25 mg/ml에서도 독성을 나타내지 않았다.

본 세포독성실험은 시료자체의 세포독성을 관찰할 뿐만 아니라 세포독성을 나타내지 않는 최대 시료농도를 결정하기 위하여 수행하였으며, 0.5 mg/ml농도에서 미강, 참깨박, 들깨박의 80% 메탄올 추출물이 상당한 세포독성을 보였으나, 이는 연속노출시(continuous exposure) 관찰된 결과이고, 실제로 quinone reductase 활성유도 실험에서 노출되는 24시간 동안에는 세포독성이 거의 관찰되지 않아 이 농도를 이후 실험에 적용하였다.

**Quinone reductase 활성소재 탐색**

항종양효소계의 하나인 QR효소활성을 증가시키는 시료에 대한 일차적인 검색결과는 Fig. 1과 같다. 참깨박, 들깨박 추출물이 QR효소활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며, 나머지 시료는 거의 효소활성에 영향을 미치지 않았다. 특히 참깨박, 들깨박의 80%메탄올추출물의 경우, 0.5 mg/ml농도에서 각각 무처리구에 비하여 QR을 2.7배와 2.9배 활성화시켰으며, 물추출물도 메탄올추출물에 비하여 훨씬 낮은 수준이지만 유의적으로 효소활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 한편 이미 QR inducer로 알려진 β-naphthoflavone(2 μM)이나 t-BHQ(30 μM)과 비교하였을 때, 전자보다는 낮았지만 t-BHQ에 비해서는 더 높은 효소활성을 나타내어(Fig. 2)



**Fig. 1. Quinone reductase induction by methanol(80%) extracts of agricultural byproducts**

RB, rice bran; WB, wheat bran; DSC, defatted soybean cake; SMR, soymilk residue; DSR, defatted sesame residue; DPR, defatted perilla residue.

강력한 inducer의 존재가 추정된다. 따라서 어떠한 성분이 이러한 활성유도를 나타내는지 알아보기 위하여 일차적으로 preparative TLC를 수행한 다음, 각 띠(band)를 분취하여 80% 메탄올로 추출하여 세포배양액에 첨가한 결과, Rf값이 가장 높은 band(Rf=0.70)에서 QR inducer 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 3, 4). 이때 전개용매로는 n-butanol : n-propanol : 2N ammonium hydroxide(10 : 60 : 30)을 사용하였으며, 전개용매의 특성에 비추어 참깨박과 들깨박에 존재하는 QR inducer는 극성이 비교적 높은 물질일 것으로 추정된다.

QR 효소활성이 유도되는 기작에 대해서는 Favreau 등<sup>(16-17)</sup>에 의해서 연구되었는데, 이들은 흰쥐의 QR유전자의 5'-regulatory sequence에 phenol계의 항산화제에 대해 반응하는 antioxidant responsive element와 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)와 같은 생체의 이물질에 반응하는 xenobiotic responsive element가 존재함을 증명하였으며, 이들 염기서열이 transcriptional activation과 관련이 있음을 보고하였다. 이렇듯 천연항산화제들을 포함한 다양한 화합물들이 QR을 활성화시킬

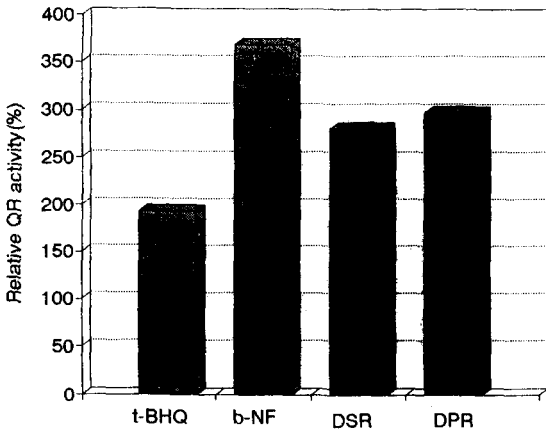


Fig. 2. Comparison of Quinone reductase induction by methanol(80%) extracts of defatted sesame and perilla residues with known inducers

The concentrations of t-BHQ and  $\beta$ -NF were 30 and 2  $\mu$ M respectively, while defatted sesame and perilla residues were added to culture medium at the level of 0.5 mg/ml. t-BHQ, *tert*-butylhydroquinone;  $\beta$ -NF,  $\beta$ -naphthoflavone; DSR, defatted sesame residue; DPR, defatted perilla residue.

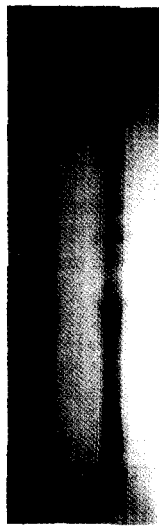


Fig. 3. Thin layer chromatograms of methanol(80%) extracts of defatted sesame(A) and perilla(B) residues

Aliquots(3  $\mu$ l) of methanol extracts(0.25g/ml) were applied to analytical TLC plate(F254) and developed in the solvent of n-butanol:n-propanol: 2N ammonia water(10: 60:30), following visualization under UV lamp(254 nm).

것으로 예상되지만<sup>(18)</sup>, 본 연구자들이 비타민 C, E를 포함한 수집종의 천연화합물을 대상으로 QR 유도활성을 탐색한 결과, 극히 일부 화합물에서만 활성증가가 관찰되어 보다 광범위한 탐색작업이 이뤄질 필요성이 있다고

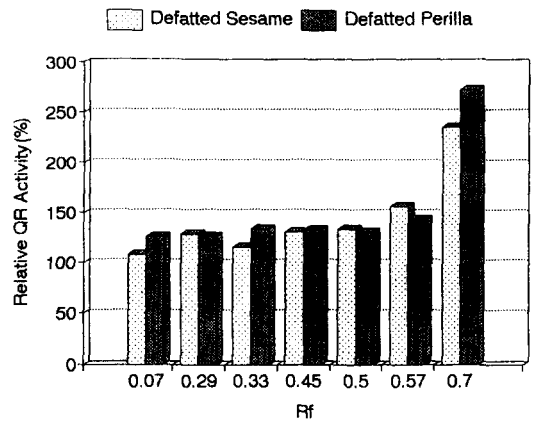


Fig. 4. Quinone reductase induction by TLC fractions isolated from methanol(80%) extracts of defatted sesame and perilla residues

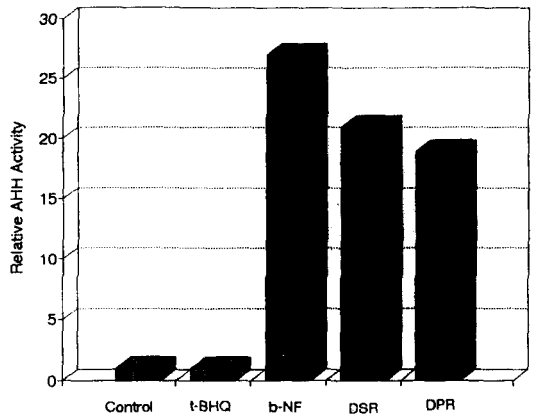


Fig. 5. Arylhydrocarbon hydroxylase induction by quinone reductase inducers

See the note under Fig. 2 for the abbreviations.

생각된다.

Aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH) 효소활성

Fig.5에 보인 바와 같이 참깨박, 들깨박은 AHH 효소활성을 상당수준으로 증가시키는 것으로 나타났다. 즉, 참깨박과 들깨박의 80% 메탄올 추출물은 0.5 mg/ml 수준에서 배양세포의 AHH 효소활성을 각각 21배와 18배 증가시켰다. 한편 t-BHQ는 보고된<sup>(6)</sup> 바와 같이 강력한 QR inducer로서 작용하지만 AHH 효소활성에는 영향을 미치지 않았다. 참깨박이나 들깨박의 경우에는 한 성분이 AHH와 QR을 동시에 증가시키는 것인지, 또는 각각의 효소를 활성화시키는 물질이 별도로 존재하는지는 향후 연구를 통하여 밝혀져야할 과제로 남아있다. AHH는 1상효소계(phase I enzyme)의 하나로 독성물질의 대사뿐만 아니라 비독성물질의 독성물질로의 활성화에도 관

련되어 있다<sup>(8,19)</sup>. QR의 활성화기작이 아직 명확히 밝혀져 있지는 않지만 그 가운데 하나가 AHH에 의하여 일차적으로 대사가 된 다음 그 대사산물이 2상효소계의 활성화를 유도한다는 것이 보고되어 있다<sup>(20)</sup>. 따라서 많은 경우 QR을 활성화시키는 성분은 AHH 효소활성도 증가시킬 가능성이 높다. 한편 AHH만 활성화 시키고 QR에는 아무런 효과를 미치지 않는 성분은 발암을 유도할 가능성이 높다 할 수 있다. 왜냐하면 AHH는 benzo(a)pyrene과 같은 물질을 발암물질로 전환시키는데 관여하는 효소이기 때문이다. 항종양효소계 활성물질로서 가장 바람직한 특성은 AHH활성을 증가시키지 않으면서 QR만 선택적으로 활성화시키는 것인데<sup>(6)</sup> 이러한 물질의 탐색을 위해서는 보다 광범위한 검색이 이뤄져야 할 것이며 이것이 실현되어 단일물질로 분리가 가능하다면 기능성식품소재로서 뿐아니라 암예방차원의 의약품으로서도 그 응용성은 높을 것으로 기대된다.

## 요 약

Quinone reductase(QR)를 포함한 2상효소계를 활성화시키는 성분들은 많은 동물실험에서 발암물질의 세포 내 작용을 억제함으로써 항종양효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 대표적인 농산부산물로서 미강, 밀기울, 탈지대두박, 두유박, 참깨박, 들깨박 등 6종의 시료에 대한 암예방효과를 갖는 물질의 존재여부를 탐색하기 위하여, mouse hepatoma cell line(Hepalclc7 cells)을 이용하여, quinone reductase활성유도 여부를 측정하였다. 참깨박과 들깨박의 80%메탄올 추출물은 0.5 mg/ml 농도에서 강력한 QR 유도활성을 나타냈으며, 같은 농도에서 다른 시료들은 거의 QR 효소활성을 증가시키지 않았다. 한편 QR효소활성을 유도하는 성분을 찾아내기 위하여 일차적으로 TLC를 수행한 결과, 참깨박과 들깨박의 메탄올 추출물 가운데 사용한 전개용매(n-butanol : n-propanol : 2N ammonium hydroxide(10 : 60 : 30))에서 가장 빨리 이동하는 분획(Rf=0.70)이 유효성분을 함유하고 있음을 확인하였으며, 현재 활성성분의 동정이 진행중에 있다.

## 감사의 말

본 연구는 1994년도 과학기술처 선도기술개발과제에 의한 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드리는 바입니다.

## 문 헌

- Weinstein, I.B.: The origins of human cancer: Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.*, **48**, 4135 (1988)
- Lin, R. I-San: Phytochemical and antioxidants. In *Functional Foods*, Goldberg, I.(ed.), Chapman and Hall, New York. p.393 (1994)
- Wattenberg, L.W.: Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents *Cancer Res.(suppl.)*, **52**, 2085s (1992)
- Yamane, T., Takahashi, T., Kuwata, K., Oya, K., Inagake, M., Kitao, M., Suganuma, M. and Fujiki, H.: Inhibition of N-Methyl-N'-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in hte rat glandular stomach. *Cancer Res.*, **55**, 2081 (1995)
- Boone, C.W., Kelloff, G.J. and Malone, W.E.: Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: A review. *Cancer Res.*, **50**, 2 (1990).
- Prochaska, H.J., De Long, M.J. and Talalay, P.: on the mechanism of induction of cancerprotective enzymes; A unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 8232 (1985)
- Prochaska, H.J. and Santamaria, A.B.: Direct measurement of NAD(P)H:Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.*, **169**, 328 (1988)
- Prochaska, H.J.: Screening strategies for the detection of anticarcinogenic enzyme inducers. *J. Nutr. Biochem.*, **5**, 360 (1994)
- De Long, M.J., Prochaska, H.J. and Talalay, P.: Induction of NAD(P) H:quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: A model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 787 (1986)
- Wattenberg, L.W. and Bueding, E.: Inhibitory effects of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione(Oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo(a)pyrene, diethylnitrosamine, and uracil mustard. *Carcinogenesis*, **7**, 1379 (1986)
- Kessler, T.W., Egner, P.A., Dolan, P.M., Groopman, J.D. and Roebuck, B.D.: Mechanism of protection against aflatoxin tumorigenicity in rats fed 5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione(Oltipraz) and related 1,2-dithiol-3-thiones and 1,2-dithiol-3-ones. *Cancer Res.*, **47**, 4271 (1987)
- Zhang, Y.S., Talalay, P., Cho, C.G. and Posner, G.H.: A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli-Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2399 (1992)
- Benson, A.M., Hunkeler, M.J., and Talalay, P.: Increase of NAD(P)H:Quinone reductase by dietary antioxidants; Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 5216 (1980)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- Nebert, D.W.: Genetic differences in microsomal electron transport:the Ah locus. *Methods in Enzymol.*, **52**, 226 (1978)
- Favreau, L.V. and Pickett, C.B.: Transcriptional regu-

- lation of the rat NAD(P)H: Quinone reductase gene. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4556 (1991)
17. Favreau, L.V. and Pickett, C.B.: Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H: Quinone reductase gene. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19875 (1993)
18. Rushmore, T.H., Morton, M.R., and Pickett, C.B.: The antioxidant element. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11632 (1991)
19. Kwak, M.K., Kim, S.G., Kwak, J.Y., Novak, R.F. and Kim, N.D.: Inhibition of cytochrome P450E1 expression by organosulfur compounds allylsulfide, allylmercaptan and allylmethylsulfide in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 531 (1994)
20. Prochaska, H.J. and Talalay, P.: Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.*, **48**, 4776 (1988)
- 
- (1995년 8월 21일 접수)