

흰쥐 간조직내 Cytochrome p-450에 의한 2-acetylaminofluorene 의 Hydroxylation에 대한 각종 Vitamin B 복합체의 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍영숙 · 김복희 · 성낙응

=Abstract=

The Effects of Vitamin B Complexes on AAF Hydroxylation by Rat Liver Microsomal Cytochrome P-450

Young Sook Hong, Bok Hoi Kim, Nak Eung Sung

Department of Biochemistry, School of Medicine, Ewha Womans University

The effects of vitamin B complexes on both ring and N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene by rat hepatic microsomal fraction were studied.

In the presence of thiamine-Hcl during incubation, the total hydroxy-AAF was increased by 50.3%. 0.1mM and 1.0mM riboflavin inhibited only total hydroxy-AAF with 56.7% and 85.0% whereas N-hydroxy AAF was increased to some extent. 1.0mM niacin did not have much effect on the total hydroxy-AAF, but 0.1mM niacin decreased the total hydroxy-AAF by 28.6%. Presence of p-aminobenzoic acid, calcium pantothenate, pyridoxal-Hcl or vitamin B₁₂ inhibited the total hydroxy-AAF to some extent. But the ratio of ring-and N-AAF hydroxylation was not changed by these vitamin B complexes.

Our present results suggest that vitamin B complexes were not effective in vitro metabolism of 2-AAF to N-hydroxy AAF(activation step of AAF) by a cytochrome p-450 dependent mixed function oxidase system.

서 론

간조직 microsome 내 약물대사에 관여하는 효소계에는 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), molecular oxygen 및 hemoprotein인 cytochrome p-450 등이 관여하며, 또한 연령, 성, 혈통, 종족, 스트레스, 흡연 및 영양상태의 영향도 받는다^{1,2)}.

최근 간조직내 약물대사 효소계에 영향을 미치는 인자 중 여러가지 형태의 영양결핍 상태와 관련되는 연구가 각방향으로 진행되고 있다. 예컨대 Dixon 등³⁾에 의하면 기아상태의 생쥐에서는 산화반응 속도는 현저히 감소되었으나, 환원반응은 증가되었음을 지적한 바 있다. 또한 Kato와 Gillette⁴⁾는 음성흰쥐에 있어 기아상태는 aminopyrine과 hexobarbital의 대사를 저하시키나, aniline의 산화반응 속도는 증가시킨다고 하

였다⁵⁾. 그러나 같은 기아상태에서도 자성 원취는 몇가지 NADPH-dependent hepatic microsomal drug metabolizing enzyme의 활성도를 증가시키는 것을 알았다⁴⁾. 동물의 영양상태에 따르는 약물대사의 변화에 대한 연구에서 지질⁶⁾, 단백질⁷⁾⁻⁹⁾, 철분¹⁰⁾¹¹⁾, 육소¹⁰⁾, vitamin C¹²⁾⁻¹⁵⁾, 및 vitamin E¹⁴⁾¹⁵⁾ 등도 어떤 영향을 미친다는 것이다.

vitamin B 복합체는 생체내의 여러 효소계에서 보조제로 작용하고 있다. 즉 thiamine 및 riboflavin이 약물대사에 관여하는 효소의 활성도에 큰 영향을 미치는 것은 기하 알고 있는 사실이나 그외의 다른 vitamin B 복합체에 대하여는 현재까지 잘 알려지지 않고 있다. 이와 같은 관점에서 저자들은 건강한 원취의 간조직내 microsome을 분리하고, 화학적 발암인자인 2-acetylaminofluorene을 사용하여 생체 외에서 이의 대사에 관여하는 cytochrome p-450 dependent mixed function oxidase system에 vitamin B 복합체가 미치는 영향을 관찰한 바 흥미있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

A. 실험재료

실험동물 : 체중 150g 내외의 음성원취(wistar strain)를 사용하였으며 원취는 실험실시전 1주간 시판배합사료로 사육하였다.

시 약 : 2-acetyl-amino-[9-¹⁴C] fluorene(sp. radioactivity 6.7mci/mmol)은 Tracer Lab.(waltham, Mass, U.S.A.)에서 구입하였다. NADPH, HEPES 및 bovine serum albumin은 Sigma Co. sigma. chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A.)를 사용하였다. Thiamine-Hcl과 pyridoxal-HCl은 wako pure chemical industries(Japan)을 사용하였고, p-aminobenzoic acid는 katayama chemical industries(Japan), riboflavin, calcium pantothenate, nicotinic acid, 및 vitamin B₁₂는 E. Merck 製를 사용하였다.

B. 실험방법

백서는 가벼운 ether 마취하에서 간장을 절제하여 microsome을 분리하였고, microsomal protein은 Lowry 방법¹⁶⁾으로 측정하였으며 bovine serum albumin을 표준액으로 사용하였다.

Microsomal cytochrome p-450은 varian sp-624 spectrophotometer로 omura와 sato의 방법¹⁷⁾에 의하여 측정하였으며 준비한 hepatic microsomal fraction

을 dithionite(sodium hydrosulfite)로 환원시키고 일산화탄소를 통과시킨 후 pigment의 spectrum을 읽었다. Cytochrome p-450의 농도는 각각 500nm와 450nm사이의 흡수율 차이(extinction coefficient difference)로 계산하였고 이때 molar extinction coefficient는 91mM⁻¹Cm⁻¹로 하였다.

AAF의 ring-과 N- hydroxylation을 위한 incubation medium으로는 50mM HEPES buffer pH 7.8, 100mM KF, 0.1mM [¹⁴C]-9-AAF 0.2uci, 272mM Acetone, 0.1mM 또는 1.0mM thiamin-HCl, niacin, riboflavin, vitamin B₁₂, calcium pantothenate, p-aminobenzoic acid, pyridoxal-HCl, 그리고 microsomal fraction을 넣어 총량을 1.0ml로 하였으며 37°C에서 5분간 incubation하였다. hydroxylated metabolite는 ethyl ether를 사용하여 추출하고 N-과 ring-hydroxy AAF는 cyclohexane: t-butanol: acetic acid: H₂O가 18:2:2:1인 Solvent system을 사용하여 paper-chromatography로 분리하고 Liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하여 정량하였다¹⁸⁾.

Table 1. The effects of vitamin B complexes on total AAF hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450 in vitro

Vitamin B complexes	Total hydroxy AAF formed /30min/mg protein		
	nmoles	%	
None	2.679±0.342	100	
Thiamin-HCl	0.1mM	2.750±0.025	102.7
	1.0mM	4.025±0.072	150.3
Niacin	0.1mM	1.913±0.126	71.4
	1.0mM	2.734±0.005	102.2
Riboflavin	0.1mM	1.160±0.028*	43.3
	1.0mM	0.402±0.004*	15.0
Vitamin B ₁₂	0.1mM	1.849±0.129*	69.0
	1.0mM	1.002±0.090*	37.4
Calcium Pantothenate	0.1mM	2.084±0.092	77.8
	1.0mM	1.677±0.028	62.6
PABA	0.1mM	2.082±0.071	77.7
	1.0mM	2.084±0.088	77.8
Pyridoxal-HCl	0.1mM	2.004±0.120	74.8
	1.0mM	2.004±0.004	74.8

Mean±S.D.

* Statistically significant(p<0.05) against Control group.

실험결과 및 고찰

정상 음성원취의 간조직 microsome 내 cytochrome p-450의 양은 0.857 ± 0.052 nmoles/mg protein이었다. 이 결과는 Sidney¹⁹⁾와 Hawswirth 등²⁰⁾이 보고한 것과 같은 치를 보여 주었다. 그리고 in vitro에서, NADPH, O₂ 및 백서의 hepatic microsome 존재 하에 화학적 발암원의 모델 화합물로서 aromatic amine인 2-acetylaminofluorene(AAF)를 사용하여 이의 대사에 여러가지 vitamin B 복합체들이 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과는 Table 1에서 보는 바와같이 vitamin을 첨가시키지않은 실험군에서는 총 hydroxy-AAF의 양이 2.679 ± 0.342 nmoles였으며, 0.1mM과 1.0mM의 thiamine-HCl을 첨가한 결과는 2.750 ± 0.025 nmoles, 4.025 ± 0.072 nmoles로 각각 2.7%, 50.3%의 증가를 보여 농도가 높아짐에 따라서 hydroxy-AAF의 양이 더 증가됨을 관찰했다. 또한 niacin을 첨가한 실험군에서는 0.1mM 첨가시는 1.913 ± 0.126 nmoles로 28.6%의 감소를 나타내었으나, 1.0mM 첨가시는 2.734 ± 0.005 nmoles로써 2.1%가 증가되었다. 그의 riboflavin, vitamin B₁₂ 및 calcium panto-

thenate 등에 있어서는 0.1mM 첨가군에서 각각 1.169 ± 0.028 nmoles, 1.849 ± 0.129 nmoles 및 2.084 ± 0.092 nmoles로써 56.7%, 31.0% 및 22.2%의 감소를 보였으나, 1.0mM 첨가군에서는 각각 0.402 ± 0.004 nmoles, 1.002 ± 0.090 nmoles, 1.677 ± 0.028 nmoles로써 85.0%, 62.6% 및 37.4%의 감소를 보여 농도가 높을수록 AAF-hydroxylation이 더 많이 억제됨을 관찰하였다. 그 중에서도 riboflavin을 첨가하였을 때 hydroxylation의 억제가 가장 현저하게 나타났다. pyridoxal-HCl과 p-aminobenzoic acid는 0.1mM 첨가군에서는 각각 2.004 ± 0.120 nmoles, 2.082 ± 0.071 nmoles였으며, 1.0mM 첨가군에서는 각각 2.004 ± 0.040 nmoles, 2.084 ± 0.088 nmoles로써 저농도와 고농도에서 비슷하게 22%와 25%의 억제를 보였다.

Aromatic amine과 amide에 의한 발암현상은 N-hydroxylation이 활성화 과정이고 ring-hydroxylation이 비활성화 과정이라는 것이 많은 연구에서 밝혀졌다¹⁷⁾²¹⁾⁻³⁴⁾. In vitro에서, vitamin B 복합체가 AAF의 활성화과정에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 대조군에서는 ring-hydroxy AAF와 N-hydroxy AAF가 각각 2.010 ± 0.030 , 0.670 ± 0.013 nmoles였으며 그 비율은 75 : 25%였다. Incubation

Table 2. The effects of vitamin B complexes on ring-and N-hydroxylation of AAF by rat liver microsomal cytochrome P-450 in vitro

Vitamin B complexes	nmoles of hydroxy AAF formed/30min/mg protein		
		ring-	N-
None		2.010 ± 0.030 (75)	0.670 ± 0.013 (25)
Thiamin-HCl	0.1mM	2.035 ± 0.017 (74)	0.716 ± 0.009 (26)
	1.0mM	2.979 ± 0.054 (74)	1.046 ± 0.012 (26)
Niacin	0.1mM	1.398 ± 0.093 (73)	0.516 ± 0.024 (27)
	1.0mM	1.999 ± 0.080 (73)	0.746 ± 0.020 (27)
Riboflavin	0.1mM	0.789 ± 0.029 (68)	0.372 ± 0.010 (32)
	1.0mM	0.274 ± 0.005 (68)	0.130 ± 0.003 (32)
Vitamin B ₁₂	0.1mM	1.422 ± 0.122 (77)	0.408 ± 0.031 (25)
	1.0mM	0.765 ± 0.050 (76)	0.240 ± 0.077 (24)
Calcium Pantothenate	0.1mM	1.584 ± 0.082 (76)	0.510 ± 0.039 (24)
	1.0mM	1.275 ± 0.110 (76)	0.411 ± 0.015 (24)
PABA	0.1mM	1.456 ± 0.064 (69)	0.625 ± 0.012 (31)
	1.0mM	1.461 ± 0.053 (70)	0.619 ± 0.008 (30)
Pyridoxal-HCl	0.1mM	1.483 ± 0.210 (74)	0.522 ± 0.051 (23)
	1.0mM	1.462 ± 0.109 (72)	0.561 ± 0.013 (28)

Mean \pm S.D.

The value in parentheses represent percentage of the respective total hydroxy AAF.

medium 속에 0.1mM 과 1.0mM 의 thiamin 첨가군에서는 각각 ring-hydroxy AAF 가 2.035 ± 0.017 nmoles, 2.979 ± 0.054 nmoles 였으며, N-hydroxy AAF는 0.716 ± 0.009 nmoles, 1.046 ± 0.012 nmoles 로써 그 비율은 74:26%로 대조군과 비교할 때 N-hydroxy-lation 양이 증가됨을 볼 수 있었다. 0.1mM 과 1.0mM 의 riboflavin 을 첨가했을 때는 ring-hydroxy AAF 가 0.789 ± 0.029 nmoles, 0.274 ± 0.050 nmoles, N-hydroxy AAF 는 0.372 ± 0.010 nmoles, 0.130 ± 0.003 nmoles 였으며 그 비율은 68:32%로써 N-hydroxy AAF 가 약간 증가됨을 볼 수 있었다. 0.1mM 과 1.0mM 의 p-aminobenzoic acid 를 첨가한 군에서는 ring-hydroxy AAF 가 1.456 ± 0.064 nmoles, 1.461 ± 0.053 nmoles 였으며 N-hydroxy AAF 는 0.625 ± 0.012 nmoles, 0.619 ± 0.008 nmoles 로써 그 비율이 69:31%를 보여 riboflavin 과 같이 N-hydroxy AAF 가 약간 증가됨을 관찰하였다. 그러나 통계학적인 유의성을 찾을수는 없었다. 그외에 niacin, vitamin B₁₂, calcium pantothenate 및 pyridoxal-HCl 을 첨가했을 때 ring 과 N-hydroxy AAF ratio 가 각각 73:27%, 76:24%, 76:24% 및 73:27%로 대조군과 비슷한 치로 큰 차이가 없었다. 결과적으로 riboflavin 과 p-aminobenzoic acid 가 AAF 의 N-hydroxylation 을 약간 증가시킴을 관찰할 수 있었을 뿐이고, 다른 vitamin B 복합체는 N-과 ring-hydroxy AAF 비율이 대조군과 비교해서 큰 변화가 없음을 나타냈다. 다시 말하면 AAF 의 활성화 단계인 N-hydroxylation 이 증가되지 않았음을 볼 수 있었다. William 과 Wade²⁶⁾는 thiamine 이 결핍된 흰쥐의 간조직 microsome 내에 있는 cytochrome p-450의 함량이 증가되고, thiamine hydrochloride 를 백서에 과량투여하였을 때는 hepatic microsomal cytochrome p-450의 함량이 감소되며, cytochrome C-reductase 의 활성도 저하된다고 보고하였다. 저자들도 이미 thiamine 이 결핍된 백서의 간조직내에 microsomal cytochrome p-450의 양이 증가되고 이 효소에 의하여 AAF 의 N-hydroxylation 이 증가됨을 보고한 바 있다²⁶⁾. 이들 결과와 비교하여보면, in vitro 에서 thiamine 을 첨가하였을 때 총 hydroxy-AAF 의 양은 증가시키나 N-hydroxy AAF 의 양은 변화시키지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Catz 등¹⁰⁾은 이유기 및 성숙한 생쥐를 riboflavin 이 결핍된 식이로 사육한 결과 cytochrome p-450 은 현저히 증가했으나, 생체외에서의 aminopyrine, aniline과 같은 물질의 산화반응은 약간 증가하였고, 또한 어린 생쥐에서 riboflavin 을 결핍시켰을 때 초기에는 hex-

obarbital 에 의한 수면시간이 감소하였으나, 오래지속되면 수면시간을 증가시킨다고 하였다. 이와는 대조적으로 Patel 과 Pauer²⁷⁾는 성숙한 흰쥐에서는 장기간의 riboflavin 결핍은 aniline acetanilide, aminopyrine, ethylmorphine 과 같은 물질의 약물대사 활성을 의의있게 감소시켰고, NADPH-cytochrome C reductase, cytochrome b₅와 p-450 그리고 총 flavin 과 같은 microsomal 내 전자전달계에 관여하는 효소를 감소시킨다고 보고하였다. 저자들은 생체외에서 incubation medium 에 riboflavin 을 첨가시켰을 때 AAF 의 N-hydroxylation 은 약간 증가하지만 총 hydroxylation 은 현저히 감소하는 것을 관찰하였으며, 이러한 결과로 미루어보아 riboflavin 은 microsomal cytochrome p-450 dependent mixed function oxidase system 에 의하여 AAF 의 hydroxylation 을 억제한다고 사료된다.

가역적인 산화와 환원 반응을 특징으로 하는 전자전달에 관여하는 보조효소인 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)와 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP)의 구성성분인 Niacin을 첨가한 실험군에서도 농도가 높아질수록 AAF 의 hydroxylation 을 억제함을 관찰할 수 있었다. 그 밖에 특정한 미생물에서 성장인자인 p-aminobenzoic acid, 백서의 anti-dermatitis 또는 antipellagra 요소로 백서에서 기본적인 물질인 pyridoxine, 그리고 acetylation 의 보조효소인 coenzyme A 의 성분인 pantothenic acid 와 antipernicious anemia 요소인 vitamin B₁₂ 첨가시에도 AAF 의 총 hydroxylation 이 억제됨을 관찰하였다. 그리고 riboflavin 과 p-aminobenzoic acid 는 총 hydroxy-AAF 의 양을 의의있게 감소시키나 N-hydroxylation 은 약간을 증가시켰을 뿐이다. 그러나 이를 제외한 다른 vitamin B 복합체는 백서의 간조직 microsomal 약물대사효소에 의한 AAF 의 총 hydroxylation 반응을 억제시킴을 볼 수 있었다.

이상의 결과들로 보아 vitamin B 복합체가 cytochrome p-450 에 의하여 발암원이 활성화되는 과정을 어느정도 억제함을 볼 수 있었다. 그러므로 vitamin B 복합체가 약물대사 효소의 활성도에 미치는 영향과 그 기전에 대하여는 앞으로 더욱 많은 연구가 기대된다.

결론

정상 음성 흰쥐의 간조직 microsomal 내에서, vitamin B 복합체가 AAF 의 N-과 ring-hydroxylation 에 미치는 영향을 관찰하였다.

1) Thiamine 은 2-AAF 의 총 hydroxylation 을 저농도(0.1mM)에서는 2.65%, 고농도(1.0mM)에서는 50.25%를 증가시켰다.

2) Niacin 은 고농도(1.0mM)에서는 총 AAF hydroxylation 을 2.06%증가시켰으나, 농도가 낮을 때(0.1mM)는 반대로 28.60%를 감소시켰다.

3) Riboflavin 은 총 hydroxy AAF 를 저농도에서(0.1mM)는 56.7%, 고농도(1.0mM)에서는 85.0%를 감소시켜서 가장 현저한 억제 효과를 나타냈다.

4) Vitamin B₁₂, calcium pantothenate, p-aminobenzoic acid 및 phridoxal-HCl 은 2-AAF 의 총 hydroxylation 을 저농도(0.1mM)에서 31.0%, 22.2%, 22.3%, 25.2%를 억제시켰으며 고농도(1.0mM)에서는 62.6%, 37.4%, 22.2%, 및 25.2%를 억제시켰다.

5) Riboflavin 과 p-aminobenzoic acid 는 AAF 의 N-hydroxylation 을 약간 증가시켰으나, 이를 제외한 다른 vitamin B 복합체는 AAF 의 ring 및 N-hydroxylation 반응비율을 변화시키지 않았다.

—References—

- 1) Conney, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19 : 317—66, 1967.
- 2) Gillette, J.R.: Factors affecting drug metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 179 : 43—66, 1971.
- 3) Dixon, R.L., R.W. Shultice and J.R. Fouts: Factors affecting by liver microsomes IV. starvation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103 : 333—335, 1960.
- 4) Kato, R. and J.R. Gillette: Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes of male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150 : 279—284, 1965.
- 5) Schenkmar, J.B., H. Remmer, and R.W. Estabrook: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* 3 : 113—123, 1967.
- 6) Wade, A.E. and W.P. Norred: Effects of dietary lipid on drug-metabolizing enzymes. *Federation Proc.* 35 : 2475—2479, 1976.
- 7) Hayes, J.R., M.U.K. Mybodile and T.C. Campbell: Dependence of Km and Vmax on substrate concentration for rat hepatic microsomal ethylmorphine N-demethylase. *Biochem. Pharmacol.* 22 : 1517—20, 1973.
- 8) Hayes, J.R. and T.C. Campbell: Effect of protein deficiency on the inducibility of the hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme system. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 1721—31, 1974.
- 9) Campbell, T.C. and I.R. Hayes: The effects of quantity and quality of dietary protein on drug metabolism. *Federation Proc.* 35 : 2470—2474, 1976.
- 10) Catz, C.Z., M.R. Juchav and S.J. Yaffe: Effects of iron, riboflavin and iodine deficiencies on hepatic drug-metabolizing enzyme systems. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 174 : 197—205, 1970.
- 11) Becking, G.C.: Hepatic drug metabolism in iron, magnesium and potassium deficient rats. *Federation Proc.* 35 : 2480—2485, 1976.
- 12) Zannoni, V.G., E.J. Flynn and M. Lynch: Ascorbic acid and drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 21 : 1377—92, 1972.
- 13) Bissell, D.M. and P.S. Guzelian: Ascorbic acid deficiency and cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 192 : 2, 569—576, 1979.
- 14) Zannoni, V.G. and P.H. Sato: The effect of certain vitamin deficiencies on hepatic drug metabolism. *Federation Proc.* 35 : 2464—2469, 1976.
- 15) Hong, Y.S. and N.E. Sung: Effects of different vitamin E-deficient basal diets on hepatic catalase and microsomal cytochrome P-450 and b₅ in rats. *Ewha Med. J.* 2 : 4, 191—194, 1979.
- 16) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
- 17) Omura, T. and R. Sato: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239 : 237, 1964.
- 18) Lotlikar, P.D., K. Wertmar and L. Luha: Role of Mixed function amine oxidase in N-hydroxylation of 2-AAF by hamster liver microsomal preparations. *Biochem. J.* 136 : 1137—1140, 1973.
- 19) Sidney, F., F. Becca, A. angelo, and C. Britt-

- on: Cytochrome_b and P-450 in liver cell fraction. *Biochim. Biophys. Acta.* 225 : 194—200, 1971.
- 20) Hauswirth, J.W. and P.P Nair: Effects of different vitamin E deficient basal diets on hepatic catalase and microsomal cytochrome P-450 and *b*₅ in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 28 : 1087—94, 1975.
- 21) Sakai, S., C.E. Reinhold, P.J. Wirth, and S.S. Thorgeirsson: The mechanism of in vitro mutagenic activation and covalent binding of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in isolated liver cell nuclei from rat and mouse. *Cancer Res.* 38 : 2058—2067, 1978.
- 22) Schut, H.A.J., P.J. Wirth, and S.S. Thorgeirsson: Mutagenic activation of N-hydroxy 2-acetylaminofluorene in the salmonella test system; the role of deacetylation by liver and Kidney fractions from mouse and rat. *Mol. Pharmacol.* 14 : 682—692, 1978
- 23) Schut, H.A.J. and S.S. Thorgeirsson: In vitro metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene by subcellular fractions from cotton rats. *Cancer Res.* 38 : 2501—2507, 1978.
- 24) Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals. *Cancer Res.* 30 : 559—576, 1970.
- 25) William, G. and H.E. Wade: The effect of thiamine consumption on liver microsomal drug-metabolizing pathways. *J. Pharma. Exp. Ther.* 176 : 3, 758—765, 1971.
- 26) Kim, B.H., Y.S. Hong, and N.E. Sung: effects of thiamine deficiency on drug hydroxylation and level of cytochrome P-450 in the rats. *Ewha Med. J.* 2 : 4, 195—199, 1979.
- 27) Patel, J.M. and S.S. Pawar: Riboflavin and drug metabolism in adult male and female rats. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 1467—1477, 1974.
-