

식용 Azo색소가 Hepatic Microsomal Mixed Function Oxidase System에 미치는 영향

尹 惠 禎 · 金 白 花

梨花女子大學校 藥學大學

(Received July 28, 1987)

The Effects of Food Azo Dyes on the Hepatic Microsomal Mixed Function Oxidase System in Rats

Hea-Chung Yun and Baek-Wha Kim*

College of Pharmacy, Ewha Womens University, Seoul 120, Korea

Abstract—The four azo dyes such as Amaranth (FD & C Red No. 2), Tartrazine (FD & C Yellow No. 4), sunset Yellow (FD & C Yellow No. 5) and Allura red (FD & C Red No. 40) are currently employed as a food additives in Korea. In this study, the effects of these azo dyes on the hepatic microsomal mixed function oxidase systems in Rats. (i.e., Cyt. P-450, Cyt. b₅, NADPH cyt. c-reductase and azo reductase) were investigated. Furthermore, to determine the relationship among the electron transport systems, each level of azo reductase, Cyt. P-450 and NADPH cyt. c-reductase was measured upon the administration of phenobarbital (known as an inducer of Cyt. P-450), 3-methylcholanthrene (Known as an inducer of Cyt. P-448), CoCl₂ (inhibitor on Cyt. P-450) or CCl₄ (inhibitor on Cyt. P-450).

The results of these studies are as follows; (1) The levels of Cyt. P-450 and Cyt. b₅ were decreased upon the administration of these azo dyes. (2) When the level of Cyt. P-450 was decreased, the azo reductase activity was also decreased. (3) These azo dyes did not show any significant effect on the level of NADPH cyt. c-reductase. (4) The administration of 3-methylcholanthrene resulted in the elevation of azo reductase activity. The 3-methylcholanthrene may be responsible for the induction of CO-insensitive electron transport system.

현대 사회에서 식품공업의 발달은 식생활의 향상과 동시에 새로운 건강상의 문제점으로 대두되고 있다. 즉, 인스턴트 식품의 이용도가 증가함에 따라 식품첨가물의 사용도 다양화되어가고 있으며, 식품 첨가물로서의 화학물질은 소량씩 장기간에 걸쳐 흡수되므로 뚜렷한 질병으로서의 진단이 어려울 뿐만 아니라 만성적인 피해를 가져올 수 있으므로 그 예방책도 대단히 어렵다. 식용 착색료중 현재 우리나라에서 사용이 허가된 azo 색소는¹⁾ amaranth, tartrazine, sunset yellow 및 allura red 등으로서 이들은 모두 수용성의 산성 tar 색소이며, 식품 외에 약품 및 화장품등에도 매우 다양하게 사용되고 있다. 그러나 azo 색소는 원래 의류의 염색이 목

적이고, amine을 diazo 화하여 azo색소를 제조할 때는 불완전한 coupling에 의해 발암성의 방향족 amine이 생성될 수 있으며, 제조 과정중 합성 출발 물질로 사용되고 있는 aniline등의 불순물이 함유될 가능성이 많으므로 아직도 문제가 많이 남아 있는 것으로 알려져 있다.²⁾ 다른 여러가지 azo 색소들도 한때는 식품 첨가물로서 사용된 바 있었으나 butter yellow는 경구투여 및 주사에 의해 hepatoma를 유발시켰고³⁾, azonaphthol 및 azonaphthylamine 유도체인 ponceau R과 ponceau 3R에 의해 간 손상, tumor 형성등의⁴⁻⁶⁾ 급성 중독 뿐 아니라 만성 중독 및 발암성이 보고되고 있어 현재는 사용이 금지되고 있다. 또한 precarcinogenic liver에서 이러한 car-

cinogenic azo 색소는 간 세포 핵의 chromatin을 dissociation(분열)시켜 gene expression(유전자 발현)에 영향을 미칠 뿐 아니라 RNA의 cytoplasm으로의 이동을 억제함으로써 핵 내의 RNA 축적 현상으로 인한 독성효과를 나타낸다는 보고가 있었다.⁷⁻⁹⁾ 현재 사용되고 있는 azo 색소 자체는 비록 독성이 거의 없다고는 하나 실제로 amaranth의 경우에 있어서도 RNA의 합성을 촉진시켰다는 보고가 있었고^{7,10)}, amaranth 0.2%의 diet로 60주 투여한 흰 쥐에서 intestinal carcinoma를, 0.4%의 diet로 72주 투여한 흰 쥐에서는 lymphosarcoma를 유발시켰다는 보고가 있었으며¹⁹⁾, sunset yellow가 mitochondria의 oxygen uptake 저해현상을 나타냈다는 보고와²³⁾ cathartic agent로서^{11,12)} 보고된 바 있다. 그 외에도 최근에는 azo 색소들의 최기성, 발암성 및 독성 효과에 관한 연구가 여러 학자들에 의해 진행되고 있으며¹⁴⁻²²⁾, 이로써 azo 색소의 환원 반응은 carcinogenic azo 색소의 해독 작용 기전으로써 임상적으로 매우 중요함을 알 수 있다. 이러한 반응을 촉매하는 reductase는 특히 간의 endoplasmic reticulum^{24,25)}이나 intestinal flora³⁾에 존재하며 1급 방향족 amine으로 대사시킨다. 그러므로 azo 색소의 독성은 azo linkage의 환원 속도에 의존 함을 알 수 있으며, 실제로 azo 색소에 대한 hepatic microsomal azo reductase 활성의 *in vitro* 실험 결과 수용성 azo 색소의 환원속도는 지용성 azo 색소보다 더 빠르며²⁶⁾, 수용성 azo 색소 중에서도 sulfonate group으로 많이 치환된 것 일수록 환원속도가 더 빠름을 보고 하였다.²⁷⁾ 이에 본실험에서는 azo 색소를 복강 내 투여 한 후 간 microsome 내에서 많은 물질의 활성화와 해독작용등 주요 대사 과정에서 전자 전달계로 작용하는 mixed function oxidase system (MFO system)에 대한 영향을 알아보기 위하여 cytochrome P-450, cytochrome b₅, NADPH cyt. c-reductase 및 azo reductase의 활성을 측정하였고, 효소상호간의 의존성을 보다 구체적으로 구명하고자 간의 물질대사 효소를 유도시키는 것으로 알려진 phenobarbital (PB) 과 3-methylcholanthrene (3-MC) 및 간의 물질

대사효소의 합성을 저해하는 것으로 알려진 cobaltous chloride (CoCl₂)와 carbon tetrachloride (CCl₄)를 각각 투여하고, Cyt. P-450 및 NADPH cyt. c-reductase의 활성에 따른 azo reductase의 활성 관계를 비교 관찰하였다.

실 험 방 법

실험동물 및 처리

실험동물로 체중 200g 전후의 웅성 흰 쥐(Sprague-Dawley Strain)를 1주일 이상동물실 환경에 적응시킨 후 실험에 이용하였으며, 실험전 24시간 동안은 물을 제외하고 절식시켰다. 실험군은 8군으로 나누고, 각 군을 9마리로 하여 다음과 같이 전 처리를 하였으며, 마지막 투여 24시간 후에 실험하였다.

(1) Carbon tetrachloride 투여군

CCl₄를 동용량의 corn oil로 희석하여 1.39g/kg으로 1회 복강내 투여하였다.

(2) Cobaltous chloride 투여군

CoCl₂를 0.9% 생리식염수에 60mg/ml로 용해하여 60mg/kg으로 1일 1회 2일간 피하 주사하였다.

(3) 3-Methylcholanthrene 투여군

3-Methylcholanthrene을 corn oil에 20mg/ml로 용해하여 25mg/kg으로 1일 1회 3일간 복강내 주사하였다.

(4) Phenobarbital 투여군

Phenobarbitone sodium을 0.9% 생리식염수에 30mg/ml로 용해하여 80mg/kg으로 1일 1회 4일간 복강내 주사하였다.

(5) Azo 색소 투여군

Azo 색소로서 amaranth, tartrazine, sunset yellow 및 allura red등을 각각 30mg/ml의 0.9% 생리식염액으로 하여 80mg/kg으로 1일 1회 4일간 복강내 주사하였다.

(6) 각 대조군은 corn oil 또는 0.9% 생리식염수를 각 실험군과 동량 주사하였다.

시 약

Phenobarbitone sodium, 3-Methylcholanthrene, Bovine serum albumin (fr. V), NADP (Nicoti-

namide Adenine Dinucleotide Phosphate), Glucose-6-phosphate, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Glucose oxidase, NADPH, Cytochrome c (type III)는 Sigma Chemical Co. 제품을, Catalase는 BDH 제품을 사용하였고, Nicotinamide, N-(1-naphthyl) ethylenediamine은 Merck 제품을 사용하였다. Amaranth, tartrazine, sunset yellow 및 allura red는 일본보건사회부 검정품을 사용하였고, prontosil은 한국 과학기술원 제조품을 사용하였다. 그의 실험에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

기 기

UV/vis Spectrophotometer(Shimadzu UV-240)
Centrifuge (Dupont Sorvall RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge)

Homogenizer(Rensel-Industry Inc.)

실험방법

Microsomal fraction의 분리—간 세포 내에서 활성 물질의 분리는 Cinti, Moldeus, Schenkman 등의 Ca⁺²-Sedimented법에 의하였다.²⁸⁾ 적출된 간의 hepatic portal vein을 통해 냉각된 0.9% 생리식염수 약 200ml를 신속히 주입하여 hemoglobin과 red blood cells을 완전히 제거하고 여지로 수분을 흡수시킨 뒤 평량하였다. ice-buckets 내에서 4°C 0.25M-sucrose로 homogenize하여 25%의 균질용액을 만들고, 이를 4°C에서 10분간 12,000g로 원심분리하여 핵과 mitochondria를 침전 제거하였다. 이의 상층액에 0.1M-CaCl₂를 가하고 15분간 27,000g로 원심분리하여 microsomal pellet을 취한 뒤 1.15% KCl용액으로 재현탁하였다.

이를 다시 15분간 27,000g로 원심분리하고 1.15% KCl용액으로 재현탁하였다. 효소 활성 측정시에는 이를 1mM의 EDTA를 함유한 50mM-sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 microsome 현탁액의 단백질 농도가 약 2.0mg/ml가 되도록 희석하여 사용하였으며, 이때 microsome 현탁액의 단백질정량은 Lowry법²⁹⁾에 의하였다.

Cytochrome P-450과 b₅의 활성 측정법—Microsomal Cyt. P-450과 Cyt. b₅의 활성 측정은 Omura와 Sato³⁰⁻³²⁾의 방법으로 측정하였다.

Cyt. P-450의 활성은 reduced carbon monoxide complex의 450nm와 490nm 사이에서의 흡수율 차이(extinction coefficient difference)로 부터 계산하였고, 이때 molar extinction coefficient는 91mM⁻¹cm⁻¹로 하였다.

Cyt. b₅의 활성은 Cyt. b₅의 환원형과 산화형 사이의 흡수율 차이를 500nm와 425nm사이에서 측정하였으며, 이때 molar extinction coefficient는 171mM⁻¹cm⁻¹로 하였다.

NADPH Cyt. c-reductase의 활성 측정법—NADPH Cyt. c-reductase의 활성 측정은 Williams and Kamin의 방법에 의하여 측정하였다.^{32,33)} NADPH 5.7mg, KCN 9.75mg 및 nicotinamide 366mg을 1mM의 EDTA를 함유한 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 100ml에 녹여 용액 I으로 하고, KCN 9.75mg 및 nicotinamide 366mg만을 녹인 100ml의 buffer 용액을 용액 III로 하였으며, cytochrome c 3.68mg/ml의 수용액을 용액 II로 하였다. Reference tube에는 용액 III (NADPH 불함유)을, sample tube에는 용액 I을 각각 2.0ml씩 넣고 cap을 닫은 후 25°C에서 8분간 반응시켰다. 각 tube에 용액 II (cytochrome c) 0.5ml씩 넣고 25°C에서 2분간 더 반응시킨 후 microsome 현탁액 0.5ml씩을 넣고 신속히 cell로 옮겨 잘 혼합하고 550nm에서 1분 간격으로 흡광도를 측정하였다. NADPH cyt. c-reductase의 활성은 1분 동안에 550nm에서 O.D 1의 변화를 나타내 주는 효소의 양을 1 unit로 하여, 1분 동안에 환원된 cytochrome c의 양으로 계산하였다. 이때 molar extinction coefficient는 19.1mM⁻¹cm²로 하였다.

Azo reductase의 활성 측정법^{26,32,34-38)}—Microsome 현탁액 1ml에 NADPH-generating system으로서 NADP⁺(0.5mM), glucose-6-phosphate (6mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (1 unit/ml)를, O₂-scavenging system으로서 glucose(60mM), glucose oxidase(10 unit/ml), catalase(3,000 unit/ml)를 가하고 50mM-sod. phosphate buffer (pH 7.4)로 최종 부피가 4ml가 되도록 한 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 미리 5분간 O₂-free N₂ gas를 통한

10 μ mole의 prontosil 1ml를 가지고 반응 tube의 head space에도 O₂-free N₂ gas를 채운 뒤 cap을 닫는 것을 반응의 시작으로 하여 37°C shaking water bath 내에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 즉시 tube를 ice bath에 넣고 냉각된 6.67% TCA (Trichloro acetic acid) 15ml를 가함으로써 반응을 완료시켰다. 공시험으로서는 기질인 prontosil 대신에 50mM-sod. phosphate buffer 용액을 사용하여 동일 조작하였다. 반응 완료 후 10,000g로 5분간 원심분리하고 protein free supernatant를 50~100mg의 active charcol을 사용하여 30분간 교반한 후 여과하여 미반응의 prontosil을 완전히 제거하였다. 반응 생성물(sulfanilamide) 5ml를 취하여 5°C 이하의 빙냉하에서 diaz화법³⁶⁾으로 정색시킨 후 540nm에서 정색도를 측정하였다. 생성된 sulfanilamide의 양은 sulfanilamide 표준 용액으로 검량선을 작성하여 계산하였고, azo reductase의 활성은 생성된 sulfanilamide의 nmoles/min/mg protein으로 표시하였다. 각 실험치는 3회 시험의 평균치와 표준오차로 표시하였으며, 유의성 검정은 student t-test로 실시하였다.

실 험 결 과

A. Azo 색소 투여가 hepatic microsomal elec-

tron transfer components 및 azo reductase 활성에 미치는 영향

80mg/kg으로 azo 색소를 1일 1회 4일간 복강 내 투여한 흰 쥐의 Cyt. P-450 및 Cyt. b₅의 함량은 0.9% 생리식염수를 투여한 대조군에 비하여 유의적인 감소현상을 나타냈으며, NADPH cyt. c-reductase 활성은 모두 감소되기는 하였으나 유의성이 없었다. 또한 azo reductase 활성은 모두 유의적으로 감소되었으며, 감소 양상은 Cyt. P-450 및 Cyt. b₅ 함량의 감소 양상과 동일하였다. (Table I)

B. Hepatic microsomal Cyt. P-450 및 NADPH Cyt. c-reductase 활성에 따른 azo reductase 활성의 비교 측정

PB 및 3-MC 투여군—80mg/kg으로 PB를 1일 1회 4일간 복강 내 투여한 흰 쥐의 Cyt. P-450, Cyt. b₅, NADPH Cyt. c-reductase 및 azo reductase 활성은 0.9% 생리식염수를 투여한 대조군에 비하여 모두 현저한 증가 현상을 나타냈고, 25mg/kg으로 3-MC를 1일 1회 3일간 복강 내 투여한 흰 쥐에서는 corn oil을 투여한 대조군에 비하여 Cyt. P-448, Cyt. b₅ 및 azo reductase의 활성을 증가시켰으며, NADPH cyt. c-reductase의 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. (Table II)

CoCl₂ 및 CCl₄ 투여군—60mg/kg으로 CoCl₂를

Table. I—Effect of azo dyes treatments *in vivo* on hepatic microsomal electron transfer components and azo reductase activity *in vitro*.

Treatment	Cytochrome P-450 (nmoles/mg microsomal protein)		Cytochrome b ₅ (nmoles/mg microsomal protein)		NADPH cyt. c reductase activity (nmoles of cytochrome c reduced/ min/mg micro- somal protein)		Azo reductase activity (nmoles of sulfanilamide formed/min/mg microsomal pro- tein)	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	0.66±0.08	100	0.36±0.01	100	64.1±4.9	100	1.8±0.07	100
Amaranth	0.44±0.04**	66.7	0.20±0.02**	55.6	61.9±3.2	96.6	1.4±0.05**	77.8
Tartrazine	0.66±0.08	100	0.25±0.01**	69.4	61.0±0.7	95.2	1.7±0.07*	94.4
Sunset yellow	0.50±0.01**	75.8	0.24±0.01**	66.7	59.6±0.5	95	1.5±0.07**	83.5
Allura red	0.54±0.01**	81.8	0.24±0.03**	66.7	60.4±0.6	94.2	1.6±0.08**	88.9

Each value represents Mean ± S.D. of 9 experiments.

Significantly different from the control value; *p<0.05 **p<0.01

Control groups were treated with physiological saline solution.

Table. II—Effect of phenobarbital-Na and 3-methylcholanthrene treatments on hepatic microsomal electron transfer components and azo reductase activity.

Treatment	Cytochrome P-450 (nmoles/mg microsomal protein)		Cytochrome b ₅ (nmoles/mg microsomal protein)		NADPH cyt. c reductase activity (nmoles of cytochrome c reduced/ min/mg microsomal protein)		Azo reductase activity (nmoles of sulfanilamide formed/min/mg microsomal protein)	
		(%)		(%)		(%)		(%)
PB Group I (control)	0.66±0.08	100	0.36±0.01	100	64.1±4.9	100	1.8±0.07	100
Group II	1.59±0.09**	237.9	0.66±0.07**	183.3	84.4±2.8**	131.7	3.1±0.29**	172.2
3-MC Group III (control)	0.71±0.15	100	0.35±0.01	100	60.8±2.9	100	1.8±0.04	100
Group IV	^a 1.41±0.05**	198.6	0.40±0.08**	114.3	62.3±5.2	102.5	1.9±0.08*	105.6

Each value represents Mean ± S.D of 9 experiments

Significantly different from the control value; *P<0.05 **P<0.01

Group I ; treated with physiological saline solution.

Group II ; treated with phenobarbital 80 mg/kg i.p. once a day for 4 days

Group III ; treated with corn oil.

Group IV ; treated with 3-methylcholanthrene 25 mg/kg i.p. once a day for 3 days

a) activity of Cyt. P-448

1일 1회 2일간 피하 주사한 흰 쥐와 1.39g/kg으로 CCl₄를 1일 1회 복강 내 투여한 흰쥐의 Cyt. P-450 및 Cyt. b₅ 함량은 0.9% 생리식염수 또는 corn oil을 투여한 대조군에 비하여 유의적인 감소 현상을 나타냈으며 NADPH cyt. c-reductase에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 azo reductase 활성은 각각의 투여

군에서 모두 유의적으로 감소되었으며, 감소양상은 Cyt. P-450 및 Cyt. b₅ 함량 감소 양상과 동일하였다. (Table III) 즉, azo reductase 활성은 Cyt. P-450 및 Cyt. P-448 함량의 증감 양상과 동일하였으며, Cyt. b₅의 존재 비율은 Cyt. P-450의 함량과 비례적이었으며, NADPH Cyt. c-reductase는 PB에 의해 유도되는 반면, 3-MC

Table. III—Effect of cobaltous chloride and carbon tetrachloride treatments on hepatic microsomal electron transfer components and azo reductase activity.

Treatment	Cytochrome P-450 (nmoles/mg microsomal protein)		Cytochrome b ₅ (nmoles/mg microsomal protein)		NADPH cyt. c reductase activity (nmoles of cytochrome c reduced/ min/mg microsomal protein)		Azo reductase activity (nmoles of sulfanilamide formed/min/mg microsomal protein)	
		(%)		(%)		(%)		(%)
CoCl ₂ Group I (control)	0.72±0.12	100	0.44±0.03	100	62.3±4.7	100	1.8±0.04	100
Group II	0.37±0.01*	52.9	0.21±0.04**	47.7	46.3±9.8	74.3	1.4±0.3*	77.8
CCl ₄ Group III (control)	0.71±0.09	100	0.33±0.03	100	48.7±5.7	100	1.8±0.06	100
Group IV	0.31±0.08**	43.7	0.19±0.06*	57.6	59.4±0.5	122.0	1.2±0.06**	66.7

Each value represents Mean ± S.D. of 9 experiments.

Significantly different from the control value; *P<0.05, **P<0.01

Group I : treated with physiological saline solution.

Group II : treated with CoCl₂ 60 mg/kg S.C once a day for 2 days

Group III : treated with corn oil.

Group IV : treated with CCl₄ 1.39g/kg I.P single injection

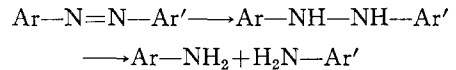
또는 CoCl_2 , CCl_4 및 azo 색소에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

고 찰

이물질(Xenobiotics)을 대사하는 일련의 효소 반응은 주로 간의 활면 소포체(smooth surface microsome)에 존재하는 mixed function oxidase system에 의하며^{24,25)}, 기질의 성질에 따라 hydroxylation, oxidative demethylation 등 여러가지 산화반응과 carbonyl, nitro 및 azo functional group을 함유한 물질의 환원반응등으로 매우 다양하다. 이러한 물질대사 효소의 활성 변동은 약물의 치료 효과 및 독성 발현과 carcinogenic 특성을 발휘하는데 밀접한 관련이 있음은^{39,40)} 주지의 사실이다. 이러한 물질대사 효소의 활성 변화는 효소 억제와 유도로 대별할 수 있으며, 의약품, 살충제 및 발암물질 뿐만 아니라 식품 첨가물질에 의해서도 물질대사 효소의 활성이 억제 또는 유도 된다는 사실이 많은 학자들에 의해 밝혀졌다.⁴¹⁾

간 조직 내 microsome에는 2종류의 전자 전달계가 존재한다.⁴²⁾(Fig. 1) 하나는 NADPH-dependent system으로서 기질과 산소의 결합 장소이며 terminal oxidase로 작용하는 Cyt. P-450, NADPH와 Cyt. P-450 사이의 전자 전달체인 NADPH cyt. c-reductase 및 phosphatidyl-choline으로 구성되어 있다. 다른 하나는 NADH depen-

dent system으로서 NADPH-dependent system 반응의 조절에 영향을 미치는 Cyt. b_5 , Cyt. b_5 -reductase 및 cyanide-sensitive factor로 구성되어 있다. 일반적으로 물질대사 능력이 증가할 때는 물질대사 효소계의 중요한 요소인 Cyt. P-450의 함량이 증가되며⁴³⁾, 이러한 Cyt. P-450에는 여러 분자형이 존재하고 이들 상이한 분자 형태들의 기질 특이성이 입증되어 있으며⁴⁴⁾, 유발 인자의 종류에 따라서도 독특한 기질 특이성을 나타낸다고 한다.⁴⁵⁾ 한편, 식품 첨가물로서 섭취된 azo 색소의 hepatic microsomal mixed function oxidase system에 의한 대사과정은 hydrazo intermediate($-\text{NH}-\text{NH}-$)를 거쳐 계속적으로 nitrogen-nitrogen bond의 reductive cleavage가 진행되어 arylamine derivatives로 된다고 추정된다.



이 반응을 촉매하는 microsomal reductase system은 cofactor로서 NADPH와 적어도 3가지의 경로가 있음을 Hernandez et al.은 제시하고 있으며, azo 색소의 환원과정을 다음과 같이 나타내고 있다.⁴⁶⁾(Fig. 2)

여기에서 pathway(1)은 NADPH cyt. c-reductase에 의한 azo reductase의 활성을, pathway(2)는 3-MC에 의해 유도되는 것으로서 co-insensitive한 경로의 azo reductase 활성을, pathway(3)은 PB에 의해 유도되는 co-sensitive한 경로의 azo reductase 활성을 나타낸다고 하였다.

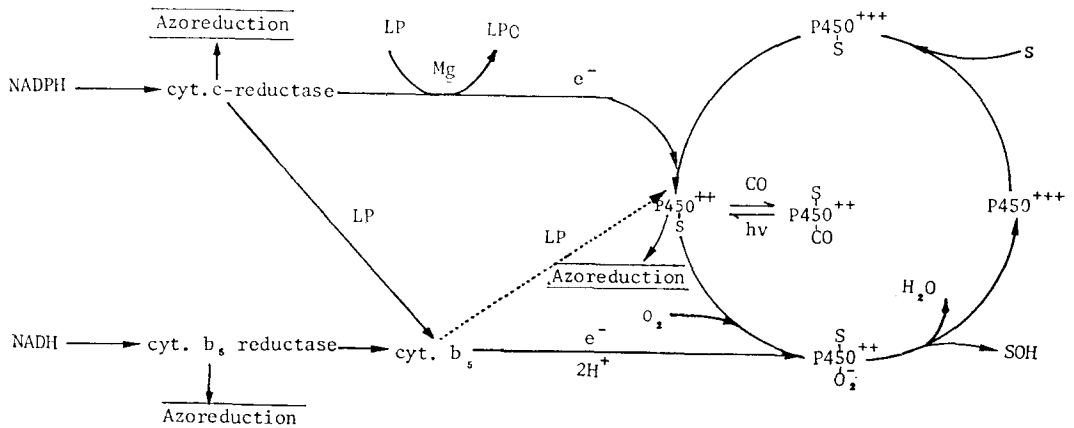


Fig. 1—Liver microsomal electron transport system.

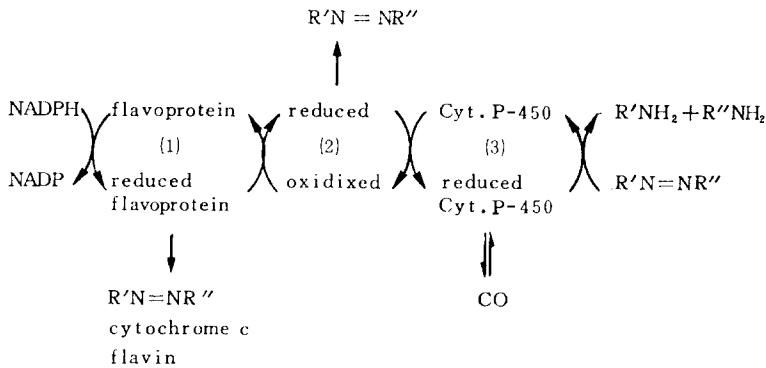


Fig. 2—Pathways for the reduction of azo dyes by hepatic microsomal enzymes.

실제로 본 실험의 결과 Cyt. P-450의 유도물질로서 알려진 PB투여 후 현저히 증가된 Cyt. P-450 함량과 동시에 azo reductase 활성은 매우 증가되었고, Cyt. P-450의 합성 억제물질로서 알려진 CoCl_2 및 CCl_4 투여 후 현저히 감소된 Cyt. P-450 함량과 동시에 azo reductase 활성 역시 매우 감소됨을 관찰하였다. 또한 azo 색소 투여후에는 CoCl_2 및 CCl_4 투여군에 비하여 Cyt. P-450 함량은 다소 큰 편이었으나 대조군에 비하여는 감소 효과를 나타냈으며 azo reductase 활성도 감소된 것으로 보아 azo reductase 활성은 Cyt. P-450 즉, PB에 의해 유도되는 co-sensitive한 경로에 의한다는 결과는 Hernandez et al.이 제시한 pathway(3)와 일치함을 보여준다. 또한 azo 색소의 투여는 NADPH cyt. c-reductase 활성에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 보아 azo reductase의 활성 저하와는 밀접한 관련이 없는 듯하고, *in vitro* 실험의 결과²⁷⁾ flavin에 의한 azo reductase 활성 증가 현상으로 보아 NADPH cyt. c-reductase는 azo 색소들을 환원시킬 수는 있으나 azo 색소에 의해 유도되지는 않는 것으로 사료된다. 3-MC의 투여에 의해 증가된 azo reductase 활성은 Cyt. P-450이 기질 특이성을 나타내고, 유도된 Cyt. P-448은 NADPH cyt. c-reductase 활성에도 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 보아 3-MC에 의해 유도되는 다른 co-insensitive한 경로에 의한 것으로 사료되며, 이는 앞서의 Hernandez et al.의 결과와 일치함을 보여준다.

결론

흰 쥐의 복강 내로 azo 색소를 투여한 후 hepatic microsomal mixed function oxidase system으로서 Cyt. P-450, Cyt. b_5 , NADPH cyt. c-reductase 및 azo reductase 활성을 측정하고, 동시에 유도 또는 합성 저해된 Cyt. P-450 함량에 대한 azo reductase의 활성을 측정하여 효소 상호간의 의존성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Sulfonate azo 색소는 hepatic microsomal Cyt. P-450 및 Cyt. b_5 의 함량을 감소시킨다.
2. Sulfonate azo 색소는 hepatic microsomal azo reductase의 활성 또한 감소시키며, 이는 감소된 Cyt. P-450의 결과로 추정된다.
3. Sulfonate azo 색소는 NADPH cyt. c-reductase 활성에 영향을 미치지 않는다.
4. Azo reductase 활성은 3-MC inducible co-insensitive한 경로에 의해서도 증가된다.

참고 문헌

- 1) 韓國食品工業協會, 「食品添加物典」 pp. 171 (1985)
- 2) 辛孝善, 申光淳, 鄭英彩, 李容旭, 「最新食品衛生學」(新光出版社) pp. 236 (1979)
- 3) Gillette, J.R. Reduction Enzymes, *Handb. Exp. Pharmacol.* 28, 349 (1971)

- 4) Watabe, T. Ozawa N. and Kobayashi, F.: Reduction of Sulphonated water-soluble azo dyes by micro-organisms from Human Faeces, *Fd. Cosmet. Toxicol.* **18**, 349 (1979)
- 5) Grice, H.C., Mannell, W.A. and Allmark, M.G. *Toxic. appl. Pharmac.* **3**, 509 (1961)
- 6) Hansen, W.H., Davis, K.J., Fitzhugh, O.G. and Nelson, A.A.: Chronic oral toxicity of Ponceau 3R, *Toxic. appl. Pharmac.* **5**, 105 (1963)
- 7) Makoto Yoshimoto, Isao Tadokoro, Yoichi Tanaka, Tadao Watanabe and Shoji Hatano: Effect of oral Administration of Azo Dyes on Organ weight, Liver components and RNA Synthesis in Rats, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **26**, 18 (1984)
- 8) Rees, K.R. and Rowland, G.F. *Biochem. J.*, **80**, 428 (1961)
- 9) Rees, K.R., Rowland, G.F. and Varcoe, J.S. *Brit. J. Cancer* **19**, 72 (1965)
- 10) Makoto Yoshimoto, Kuniaki Noda, Shoji Hatano and Tadao Watanabe: Effect of Coal Tar Dyes on viability and RNA and Protein Synthesis in Isolated Rat Hepatocyte, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **25**, 347 (1984)
- 11) Yoshimoto, M., Hatano, S. and Watanabe, T.: Effects of oral Administration of Azo Dyes on RNA Synthesis in Rat Liver Nuclei, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **24**, 408 (1983)
- 12) Radomski, J.L. and Mellinger, T.J.: The Absorption, Fate and Excretion in Rat of the water-soluble Azo Dyes, FD & C Yellow No. 6, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **136**, 259 (1962)
- 13) Radomski, J.L. and Deichmann, W.M.B.: Cathartic action and metabolism of certain Coal Tar Food Dyes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **118**, 322 (1956)
- 14) Khera, K.S., Przybylski, W. and Mckinley, W.P.: Implantation and embryonic survival in Rats treated with Amaranth during gestion, *Fd. Cosmet. Toxicol.* **12**, 507 (1974)
- 15) Larsson, K.S.: A Teratologic study with the dyes Amaranth and Ponceau 4R in mice, *Toxicology* **4**, 75 (1975)
- 16) Keplinger, M.L., Wright, P.L., Plank, J.B. and Calan, J.C.: Teratologic studies with FD & C Red No. 2 in rats and rabbits, *Toxic. appl. Pharmac.* **28**, 209 (1974)
- 17) Khera, K.S., Roberts, G., Trivett, G., Geraldine Terry and Carole Whalen: A Teratogenicity study with Amaranth in Cats, *Toxic. appl. Pharmac.* **38**, 389 (1976)
- 18) Collins, T.F.X., and Mclaughlin, J.: Teratology studies on Food Colourings. Part II. bmbryotoxicity of R salt and Metabolites of Amaranth (FD & C red No. 2) in Rats, *Fd. Cosmet. Toxicol.* **11**, 355 (1973)
- 19) Drake, J.J.P., Bibra: The Amaranth debate, *Int. Flavours Food Addit.* **6**, 116 (1975)
- 20) Mannell, W.A., Grice, H.C., Lu, F.C. and Allanark, M.G.: Chronic toxicity studies on Food Colours. Part IV. observations on the Toxicity of Tartrazine, Amaranth and Sunset Yellow in Rats, *J. Pharm. Pharmacol.* **10**, 625 (1958)
- 21) Alan, B.P., Patricia, A.H. and Kirschman, J.C.: The fate of FD & C Red No.2 and its Metabolite, Naphthionic acid, after different routes of Administration in the Rat, *Toxic. appl. Pharmac.* **35**, 1 (1976)
- 22) Collins, T.F.X., Keeler, H.V., Black, T.N. and Ruggles, D.I.: Long-Term effects of Dietary Amaranth in Rats, *Toxicology* **3**, 115 (1975)
- 23) Noda, K., Yoshimoto, M., Hatano, S. and Watanabe, T.: Effects of Coal Tar Dyes on oxygen uptake in Mitochondria Isolated from Rat Liver, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **26**, 203 (1985)
- 24) Theodore, E.G., Larry, A.R. and James, R.F.: Effect of pretreatment of Rabbits with phenobarbital or 3-Methylcholanthrene on the distribution of drug-metabolizing enzyme activity in subfraction of hepatic microsomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **157**, 435 (1967)
- 25) Theodore, E.G., Larry, A.R. and James, R.F.: Further studies on the Metabolism of drug by subfractions of hepatic microsomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **155**, 479 (1966)
- 26) Shargel, L., Ali R.B. and Simon, H.K.: Relationship between Azo Dye structure and Rat Hepatic Azoreductase activity, *Journal of Pharmaceutical*

- Sciences* **73**, 161 (1984)
- 27) 元亨蘭, 食用 Azo 色素가 肝의 microsomal azo reductase 에 미치는 영향과 Flavin의 효과. 이화여자대학교 대학원 석사 학위 논문 (1986)
- 28) Cinti, D.L., Moldeus, P. and Schenkman, J.B.: Kinetic parameters of drug metabolizing enzymes in Ca²⁺-Sedimented microsomes from Rat Liver, *Biochemical Pharmacology* **21**, 3249 (1972)
- 29) 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)
- 30) Omura, T. and Sato, R.: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes, *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964)
- 31) Omura, T. and Sato, R.: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes, *J. Biol. Chem.* **239**, 2379 (1964)
- 32) Mazel, P.: Experiments illustrating Drug Metabolism in Vitro Chapter 27. *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition*, Williams and Wilkins, Baltimore (1971)
- 33) Williams, C.H. and Kamin, H.: Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide-cytochrome c-reductase of Liver, *J. Biol. Chem.* **237**, 587 (1961)
- 34) Mallett, A.K., King, L.J. and Walker, R.: A continuous spectrophotometric determination of hepatic microsomal azo reductase activity and its dependence cytochrome P-450, *Biochem. J.* **210**, 589 (1982)
- 35) Fouts, J.R., Kamm, J.J. and Berodic, B.B.: Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **120**, 291 (1957)
- 34) Bratton, A.C. and Marshall, E.K.: A New Coupling component for sulfanilamide determination, *J. Biol. Chem.* **128**, 537 (1939)
- 37) Gram, T.E. and Fouts, J.R.: Further studies on the Metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes III. Effects of the NADPH-Generating system, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **158**, 317 (1967)
- 38) Mason, R.P., Peterson, F.J. and Holzman, J.L.: Inhibition of Azoreductase by oxygen, *Molecular Pharmacology* **14**, 665 (1978)
- 39) Nelson, S.D.: *Burger's Medicinal Chemistry* **4**, 227 (1980)
- 40) Anders, M.W., *Ann. Rev. Pharmacol.* **11**, 37 (1971)
- 41) Conney, A.H. *Pharmacological Review* **19**, 317 (1967)
- 42) Anthony, Y.H.Lu: Liver microsomal Drug-metabolizing enzyme system: Functional components and their properties, *Federation Proceedings* **35**, 2460 (1976)
- 43) Long, R.F.: Introduction of drug metabolizing enzymes and cytochrome P-450, *Biochem. J.* (proceedings) **115**, 269 (1969)
- 44) Tomas, P.E., Ryan, L.D. and Wert, S.B.: Multiple forms of Rat Liver cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.* **251**, 1385 (1976)
- 45) Shurma, R.E., Cameron, R.G., Faber, E. and Griffin, M.J.: Multiplicity of induction patterns of rat liver microsomal monooxygenases and other polypeptides produced by administration of various xenobiotics, *Biochem. J.* **182**, 317 (1979)
- 46) Shargel, L. and Mazel, P.: Effect of riboflavin deficiency on Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene induction of microsomal drug-metabolizing enzymes of the Rat, *Biochemical Pharmacology* **22**, 2365 (1973)