

대추 메탄올 추출액이 Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간기능 장애에 미치는 영향

이윤경 · 조수열[†]

영남대학교 식품영양학과

Effect of Jujube Methanol Extract on Benzo(a)pyrene Induced Hepatotoxicity

Yoon-Gyeong Lee and Soo-Yeul Cho[†]

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract

The protective effect of jujube methanol extract on benzo(a)pyrene (B(a)P)-induced liver injury was studied in rats *in vitro* and *in vivo*. Jujube methanol extract significantly recovered the enzyme activities (GOT, GPT, LDH and ALP) and lipid contents (total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol) changed by B(a)P to normal levels *in vivo*. *in vitro* experiment jujube methanol extract didn't stimulate hepatocyte proliferation but significantly recovered the enzyme activities (GOT, GPT and LDH) in comparison to group II administered B(a)P only. It was suggested that jujube methanol extract have a protective effect on liver injury by B(a)P.

Key words : benzo(a)pyrene (B(a)P), protective effect, enzyme activities, lipid contents

서 론

대추 (*Ziziphus jujuba* Mill.)는 낙엽 활엽 교목으로 갈매나무과 (*Rhamnaceae*)에 속하며 사용부위는 성숙한 과실 (*Ziziphi Fructus*)이다. 과육 및 인은 옛부터 약용 및 식용으로 이용되고 있고 백추(대추)는 소화 완화 강장약으로 광범위하게 이용되는 한방요약이며 대추죽, 대추차, 떡이나 약밥으로 널리 이용되고 있다. 대추는 만성간염, 온몸쇠약, 영양부족 등에 이용되어 왔으며 「신농본초경」에서는 대추가 비장을 보양하고 십이경을 도우며, 백약의 독을 누그러뜨린다고 하였고 「약품화의」에서는 혈을 길러 간을 보(補)한다고 하였다. 대추의 약리작용으로는 항 알레르기작용, 근수축력 증강작용, 간보호작용 등이 알려져 있고¹⁾ 빈혈증, 결핵, 기관지염 및 신경쇠약 등의 치료에도 유효한 것으로 알려져 있다. 남부 유럽인들은 대추를 사탕 또는 디저트용으로 이용할 뿐만 아니라 타블렛이나 시럽의 형태로 폐결핵약 또는 기침약으로 사용하고 있다²⁾. 한편, benzo(a)pyrene(B(a)P)은 환경 오염물질 중 강력한

간독성 유발물질일 뿐만 아니라 발암물질로써 다수의 실험동물에서 다양한 노출경로를 통해 폐, 피부, 위장 부위에 종양을 유발시키는 것으로 알려져 있다^{3,4)}. B(a)P은 최종 대사체인 dihydrodiol epoxide가 DNA와 반응하게 되어 DNA 변성 및 염기쌍 분열을 초래하므로써 미생물을 포함하여 포유동물 세포에 강한 돌연변이 원성을 나타내게 된다⁵⁾. 일반적으로 B(a)P에 관한 연구로는 유전자변이 및 발암독성에 관한 연구⁶⁻⁸⁾가 행해지고 있으나 target organ인 간조직에서의 독성발현에 관한 연구는 아직 활발하지 않는 실정이다. 우리나라는 유달리 간염의 발병율이 높고⁹⁾ 요즈음은 여러가지 질병 중 특히 간장질환이 급증하고 있는 추세에 있으므로 본 연구에서는 간질환 치료 또는 보간에 유효한 천연물을 개발하기 위해 B(a)P을 rat에 투여하여 실험적 간손상을 유도한 후 *in vitro*와 *in vivo*에서 효소 활성도와 지질 함량변화를 측정하였으며 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT assay) 법을 이용하여 대추 메탄올 추출액의 간장 보호 효과를 알아보았다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

시료의 조제

대추의 메탄올 추출액은 Scheme 1과 같이 추출하여 감압 농축한 후 증류수로 희석하여 사용하였다.

실험 I (in vitro)

간세포의 분리와 배양

간세포의 분리는 *in situ* collagenase perfusion법¹⁰⁾으로 다음과 같이 수행하였다. 이 방법은 선단에 cannula를 부착한 silicone tube를 장치한 peristaltic pump를 이용하여 간을 관류하고 소화시키는 방법으로 체중 200g 정도의 S.D.계 웅성 rat에 nembutal (pentobarbital, 50mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 개복하고 간문맥에 cannula (17×G)를 삽입하여 고정한다. 37°C의 전관류액을 peristaltic pump로 25ml/min속도로 관류시키고 동시에 복부 대정맥을 절단하여 사혈시킨다. 그리고 난 후 흉부 대정맥에 또 하나의 cannula (17×G)를 삽입하고 복부 대정맥을 완전히 폐쇄하여 간 문맥으로 주입된 전관류액을 흉부 대정맥쪽으로 흐르게 하여 간을 완전히 탈혈시킨 다음 0.05% collagenase액을 15ml/min 속도로 관류하여 *in situ*에서 간을 소화시켰다. 소화된 간엽은 떼어내어 적당량의 MEM (Eagle's minimum essential medium E)을 가하여 세절하고 250 μm tissue sieve로 여과하여 간세포를 분리하였다. 분리한 간세포는 4°C에서 50×g로 원심분리하고 pellet

를 MEM으로 현탁하여 tryphan blue exclusion test로 생존율이 80% 이상일 때 실험에 이용하였다. 저속 원심분리법으로 정제한 간세포 현탁액에 William's E 배지를 가하여 5×10⁵cells/ml되게 조정한 후, 500μl씩 24-well plate (Corning Co.)의 각 well에 분주하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 전배양하였다. 전배양 후 배지를 갈아주고 다시 12시간 배양한 다음 *in vitro* 실험을 위한 초대배양 간세포로 하였다. 초대배양 간세포는 *in vivo* 실험과 동일하게 4군으로 나누어 실험을 하였는데 I군은 대추 추출액과 B(a)P을 투여하지 않은 정상군, II군은 B(a)P만 투여한 군, III군은 대추 추출액만 투여한 군, 그리고 IV군은 대추 추출액과 B(a)P을 모두 투여한 군으로 하였으며 대추 메탄올 추출액 (최종농도 625μg/ml)와 B(a)P (최종농도 50μm)을 투여한 후 다시 20~24시간 배양 후 실험하였다.

MTT assay법¹¹⁾을 이용한 시료가 간세포 증식에 미치는 영향 측정

초대배양 간세포에 Millipore filter로 여과멸균한 MTT(1mg/ml in phosphate-buffered saline)용액을 배양 plate의 각 well당 50μl씩 넣은 후 37°C의 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 incubation시켰다. 그 후 plate에 생성된 formazan 결정들을 dimethylsulfoxide (DMSO)로 용해시키고 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 percent survival로 나타내었다. 간세포 생존율 (percent survival)은 대추 추출액과 B(a)P을 모두 투여하지 않은 정상군을 대조군으로 하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도의 비율로 표시하였다.

$$\text{Percent survival} = \frac{\text{Optical density of sample}}{\text{Optical density of control}} \times 100$$

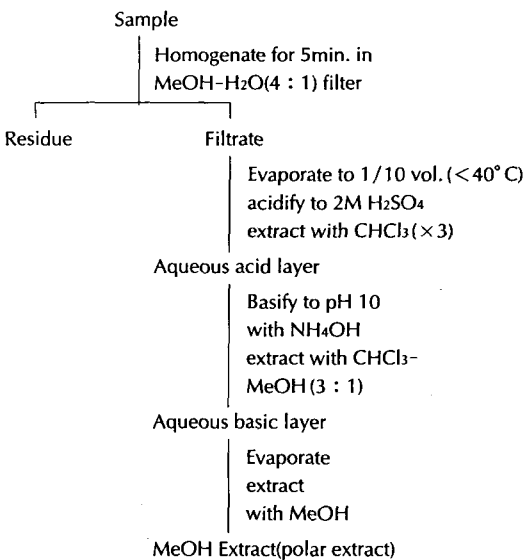
간세포 독성에 대한 시료의 보호 효과 측정

초대배양 간세포에 대추 메탄올 추출액 (최종농도 625μg/ml)과 B(a)P (최종농도 50μm)을 첨가하여 20~24시간 배양한 후 glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 활성도는 Reitman-Frankel법¹²⁾, lactate dehydrogenase (LDH) 활성도는 Berga-Broid법¹³⁾으로 측정하였다.

실험 II (in vivo)

실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 체중 110±10g, Sprague-Dawley계 웅성 rat를 1주간 기본식이 (Table 1)와



Scheme 1. A procedure for fractionating of jujube.

물을 충분히 공급하면서 적응시킨 후 난괴법에 따라 군 당 8마리씩 하여 4군으로 나누어 1주간 사육하였다. Group I은 대추 추출액과 B(a)P를 투여하지 않은 정상군, Group II는 B(a)P만 투여한 군, Group III는 대추 추출액만 투여한 군 그리고 Group IV는 대추 추출액과 B(a)P를 모두 투여한 군으로 이 때 B(a)P는 대추 추출액을 투여한 마지막 날에 1회 복강주사하였다. 시료의 투여량은 0.25g/kg/day로 하여 1주일간 1일 1회 정시간에 feeding tube로 경구투여하였으며 B(a)P는 0.1mg/kg의 양으로 1회 복강주사하였다.

생화학 검사용 시료액의 조제

B(a)P과 시료를 투여한 S.D계 웅성 rat의 복부 대동맥으로부터 채혈한 뒤 원심분리 (600×g, 15min)하여 얻은 상등액을 혈청으로 사용하였고 간장을 마쇄한 후 원심분리하여 얻은 mitochondrial fraction을 이용하여 효소 활성도를 측정하였다. 간조직 중의 지질 추출은 Folch 등의 방법¹⁴⁾으로 행하였다.

혈청과 간조직중의 효소 활성도 및 지질 함량 측정

Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 및 lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정은 초대배양 간세포에서의 효소 활성도 측정법과 동일한 방법으로 행하였고 alkaline phosphatase (ALP) 활성도 측정은 Kind-King법¹⁵⁾ 그리고 HDL-cholesterol, total cholesterol (TC) 및 triglyceride (TG) 함량 측정은 조제된 kit(Eiken, Japan)를 사용하여 행하였다.

통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 SAS program을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's new multiple range test¹⁶⁾로 검증하였다.

Table 1. Composition of basal diet (%)

| Ingredients | Content |
|---------------------|---------|
| Casein | 20.0 |
| DL-Methionine | 0.3 |
| Corn starch | 50.0 |
| Sucrose | 15.0 |
| Cellulose | 5.0 |
| Corn oil | 5.0 |
| AIN-mineral mixture | 3.5 |
| AIN-vitamin mixture | 1.0 |
| Choline chloride | 0.2 |

결과 및 고찰

실험 I (in vitro)

대추 메탄올 추출액과 B(a)P이 간세포의 증식에 미치는 영향과 이들의 간세포에 대한 독성을 MTT assay와 효소 활성도 변화를 이용하여 측정하였다.

MTT assay를 이용한 대추 메탄올 추출액의 간보호 효과 측정

MTT assay는 colorimetric tetrazolium assay로 방사성 동위원소를 사용하지 않고 기질과 생성물이 서로 다른 파장에서 흡수극대를 나타내므로 배양액을 제거한 이후에 별도의 수세과정이 필요없으므로 조작이 비교적 간편하고 신속, 정확하다는 장점이 있어 세포증식, 세포독성 및 세포활성 측정에 많이 이용되고 있다¹⁷⁾. MTT assay 결과, 대추의 메탄올 추출액은 간세포 증식을 촉진시키지는 않았으나 B(a)P으로 인해 낮아진 세포 생존율을 약 48% 정도 유의성 있게 상승시켜 정상수준으로 회복시켰다 (Table 2).

효소 활성도 변화를 이용한 대추 메탄올 추출액의 간보호 효과 측정

B(a)P을 처리한 초대배양 간세포에 대추 메탄올 추출액을 병행 처리하고 간세포의 GOT, GPT 그리고 LDH의 활성도를 측정한 결과는 다음과 같다. 대추의 메탄올 추출액은 B(a)P 독성으로 인해 변화한 LDH의 활성도를 정상수준으로 유의성 있게 회복시켰다. 또한 B(a)P으로 인해 상승한 GOT와 GPT의 활성도를 정상수준으로 유의성 있게 감소시켰는데 GOT와 GPT의 활성도 둘 모두를 약 8% 정도 감소시켰다 (Table 3).

Table 2. The Effect of jujube MeOH extract on percent survival of B(a)P-treated primary cultured hepatocytes

| Group | Percent survival (%) |
|-------|--------------------------|
| I | 99.91±4.45 ^a |
| II | 67.31±6.92 ^b |
| III | 100.39±6.54 ^a |
| IV | 99.62±8.94 ^a |

Values with common superscript letter are not significantly different (p<0.05)

- I : This group was not treated with jujube extract and B(a)P
- II : This group was treated with B(a)P
- III : This group was treated with jujube extract
- IV : This group was treated with jujube extract and B(a)P

실험 II (in vivo)

혈청중의 효소 활성도와 지질 함량 변화

혈청 효소 활성도와 지질 함량 변화에 미치는 대추 메탄올 추출액의 영향은 Table 4, 5와 같다. 혈청 GOT, GPT, ALP 그리고 LDH의 활성도는 B(a)P의 투여로 인해 유의성 있게 상승하였고 대추 메탄올 추출액이 상승한 GOT, GPT 및 ALP의 활성도를 B(a)P 단독 투여군에 비해 각각 약 26%, 24% 그리고 34% 정도 유의하게 감소시켰고 LDH 활성도도 상당히 감소시켰다. 간조직 중의 TG와 TC 함량은 B(a)P의 투여로 유의하게 증가하였으며 HDL-cholesterol 함량은 유의하게 감소하였다. 대추 메탄올 추출액은 B(a)P의 투여로 인해 변화한 지질 함량을 정상수준으로 유의성 있게 회복시켰다. HDL-cholesterol 함량의 경우 B(a)P 투여로 현저히 감소하였으나 메탄올 추출액 투여로 약 33% 상승하였다. 또한 B(a)P으로 인해 상승한 TG나 TC 함량은 대추 추출액의 투여로 B(a)P 단독 투여군 보다 둘 모두 약 27% 정도 감소하였다.

간조직중의 효소 활성도와 지질 함량 변화

간조직 중의 효소 활성도와 지질 함량 변화는 Table

Table 3. The effect of jujube MeOH extract on enzyme activities of B(a)P-treated primary cultured hepatocytes

| Group | GOT (%) | GPT (%) | LDH (%) |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| I | 100.07±2.13 ^b | 100.42±1.51 ^b | 100.00±1.70 ^a |
| II | 109.65±3.00 ^a | 108.29±1.96 ^a | 90.36±1.75 ^c |
| III | 100.90±2.25 ^b | 100.48±1.75 ^b | 96.84±0.65 ^b |
| IV | 101.90±2.23 ^b | 99.93±2.61 ^b | 98.43±1.70 ^{ab} |

Values with common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05)

- I : This group was not treated with jujube extract and B(a)P
- II : This group was treated with B(a)P
- III : This group was treated with jujube extract
- IV : This group was treated with jujube extract and B(a)P

Table 4. The effect of jujube MeOH extract on the serum enzyme activities in B(a)P-treated rats

| Group | Serum | | | |
|-------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|---|
| | GOT (K. unit/ml) | GPT (K. unit/ml) | ALP (K.A. unit/ml) | LDH (× 10 ³) (B.B. unit/ml) |
| I | 129.90±15.49 ^b | 29.38± 1.49 ^b | 29.08±5.35 ^b | 14.34±1.06 ^c |
| II | 216.50±42.56 ^a | 42.25±5.32 ^a | 42.50±3.94 ^a | 17.28±0.60 ^a |
| III | 142.75±12.82 ^b | 28.18±1.59 ^b | 26.25±2.96 ^b | 17.77±0.13 ^a |
| IV | 160.50± 7.72 ^b | 32.13±3.47 ^b | 28.08±3.05 ^b | 16.17±0.53 ^b |

Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05)

- I : This group was not treated with jujube extract and B(a)P
- II : This group was treated with B(a)P
- III : This group was treated with jujube extract
- IV : This group was treated with jujube extract and B(a)P
- K. unit/ml : Karmen unit/ml
- K.A. unit/ml : King-Armstrong unit/ml
- B.B. unit/ml : Berga-Broid unit/ml

6, 7과 같다. ALP를 제외한 다른 효소들은 실험군들 간에 유의적인 차이가 없었다. ALP 활성은 B(a)P 투여로 유의성 있게 상승하였으나 대추 메탄올 추출액이 상승한 ALP 활성도를 정상수준으로 유의성 있게 낮추었다. 또한, 간조직 중의 지질 함량은 B(a)P의 투여로 유의하게 상승하였고 대추 메탄올 추출액은 TG와 TC 함량을 B(a)P 단독 투여군에 비해 유의성 있게 감소시켜 상승한 TC 함량을 약 15% 낮추었다. 그러나 TG 함량에 있어서는 메탄올 추출액이 B(a)P로 인해 상승한 TG 함량을 정상수준으로 까지 회복시키지는 못하였다.

이상의 결과는 1977년 중앙대사전에서 대추 물추출물이 CCl₄로 유발한 간장해에 대해 보호작용을 갖는다는 보고와 일치하며 대추에 근채근(芹菜根)을 배합하여 수전복(水煎服)하면 혈청 cholesterol을 저하시킨다는 보고¹⁾와도 일치한다.

체내로 흡수되어진 xenobiotics의 대부분은 간조직 중에서 phase I 반응 또는 phase II 반응을 통해서, 아니면 phase I 과 phase II 반응 모두를 통해 대사되어 체외로 배설되어진다^{17,18)} Phase I 반응의 산화과정은 간장

Table 5. The effect of jujube MeOH extract on the serum lipid contents in B(a)P-treated rats

| Group | Serum | | |
|-------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | HDL-cholesterol (mg/dl) | Total cholesterol (mg/dl) | Triglyceride (mg/dl) |
| I | 28.72±2.90 ^a | 65.76±5.70 ^b | 55.13± 5.77 ^b |
| II | 22.16±2.01 ^b | 87.97±3.80 ^a | 89.53±14.04 ^a |
| III | 30.63±1.08 ^a | 71.47±4.50 ^b | 51.65± 5.86 ^b |
| IV | 29.47±2.41 ^a | 63.92±5.73 ^b | 65.31± 6.09 ^b |

Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05)

- I : This group was not treated with jujube MeOH extract and B(a)P
- II : This group was treated with B(a)P
- III : This group was treated with jujube MeOH extract
- IV : This group was treated with jujube MeOH extract and B(a)P

Table 6. The effect of jujube MeOH extract on the liver enzyme activities in B(a)P-treated rats

| Group | Liver | | | |
|-------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | GOT($\times 10^3$)(K. unit/g) | GPT($\times 10^3$)(K. unit/g) | ALP(K.A. unit/g) | LDH($\times 10^3$)(B.B. unit/g) |
| I | 70.00 \pm 3.74 ^a | 28.83 \pm 1.73 ^a | 10.15 \pm 1.06 ^b | 18.97 \pm 0.08 ^a |
| II | 74.25 \pm 4.57 ^a | 27.75 \pm 2.99 ^a | 13.43 \pm 2.25 ^a | 19.08 \pm 0.08 ^a |
| III | 76.50 \pm 5.20 ^a | 27.45 \pm 1.93 ^a | 10.20 \pm 2.35 ^b | 19.04 \pm 0.07 ^a |
| IV | 72.25 \pm 5.12 ^a | 25.70 \pm 2.12 ^a | 10.33 \pm 0.96 ^b | 19.07 \pm 0.04 ^a |

Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

I : This group was not treated with jujube MeOH extract and B(a)P

K. unit/g : Karmen unit/g

II : This group was treated with B(a)P

K.A. unit/g : King-Armstrong unit/g

III : This group was treated with jujube MeOH extract

B.B. unit/g : Berga-Broid unit/g

IV : This group was treated with jujube MeOH extract and B(a)P

Table 7. The effect of jujube MeOH extract on the liver lipid contents in B(a)P-treated rats

| Group | Liver | |
|-------|------------------------------|---------------------------------|
| | Total cholesterol (mg/g) | Triglyceride (mg/g) |
| I | 6.68 \pm 1.19 ^b | 18.55 \pm 3.47 ^c |
| II | 8.56 \pm 0.71 ^a | 28.89 \pm 3.30 ^a |
| III | 7.25 \pm 0.54 ^b | 21.12 \pm 1.17 ^{b,c} |
| IV | 7.30 \pm 0.47 ^b | 24.07 \pm 2.01 ^b |

Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

I : This group was not treated with jujube MeOH extract and B(a)P

II : This group was treated with B(a)P

III : This group was treated with jujube MeOH extract

IV : This group was treated with jujube MeOH extract and B(a)P

의 소포체에 다량 존재하는 monooxygenase system에 의해 이루어지는데, phase I 반응으로 생성된 중간생성물은 그 독성이 parent compound 보다 더 강하여 조직에 손상을 입힐 수 있으나 연이은 phase II 반응의 활성화로 조직이 그 독성의 영향을 받지 않고 반응 중간생성물을 배설시킬 수 있어 생체는 항상성이 유지된다. B(a)P 대사 역시 두 phase로 일어나는데 phase I에서는 monooxygenase에 의해 산화된 유도체들로 전환이 되고 phase II에서는 phase I에서 생성된 대사산물들이 cytosol에 주로 존재하는 효소에 의해 sulfate, glucuronic acid 또는 glutathione과 결합하여 배설되기에 충분하리 만큼 물에 잘 녹는 물질로 된다¹⁹⁾.

*in vitro*와 *in vivo* 실험의 결과 B(a)P은 혈청 효소 활성도와 지질 함량을 증가시킬 뿐만 아니라 간조직 중의 지질 함량도 증가시켰는데 이는 B(a)P이 간조직의 효소계를 손상시킬 뿐 아니라 간세포의 microsome이 B(a)P에 의해 심한 손상을 입게되어 mixed-function oxidase(MFO)의 전반적인 disorganization이 일어난다는 보고와 B(a)P 투여는 간조직의 각종 효소 활성도를 상당히 손상시키고 시일이 경과함에 따라 거의 완전히

파괴한다는 보고와 일치하며 또한 B(a)P이 lipoprotein 합성을 저해하여 실험동물의 간장에 지방침윤을 일으킨다는 보고와도 일치한다^{20,21)}.

이상을 종합하여 볼 때 대추 추출액이 *in vitro*와 *in vivo*에서 B(a)P에 의해 유도된 대부분의 효소 활성도 및 지질 함량 증가를 감소시킨 것은 이것이 간세포의 피사와 효소의 유출을 저해하고 간세포막의 투과성 항진을 억제할 뿐만 아니라 중혈작용이 있어 간의 혈행을 좋게하므로써 보간작용을 한 것으로 사료된다.

요 약

대추 메탄올 추출액이 B(a)P에 의해 유도된 간손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐에게 1주일간 대추 추출액을 1일 1회 경구투여하고 B(a)P을 대추 메탄올 추출액을 투여한 마지막 날에 1회 복강주사하여 효소 활성도와 지질 함량 변화를 측정하고 MTT assay를 수행한 결과는 다음과 같다. *in vitro* 실험에서 B(a)P은 간세포에 대해 현저한 세포독성을 나타내었으며 대추 메탄올 추출액은 이러한 세포독성을 정상수준으로 유의성 있게 회복시켰다. 또한 *in vivo* 실험에서도 B(a)P의 투여는 효소 활성도와 지질 함량을 유의성 있게 상승시켰고 대추 추출액은 이러한 상승을 유의성 있게 감소시켰다. 따라서 대추 메탄올 추출액은 *in vitro*와 *in vivo*에서 공히 B(a)P으로 인한 간손상에 뚜렷한 보호효과를 나타내었는데 이는 대추 추출액이 간의 저항력 및 간세포 기능을 유지시키므로써 보간작용을 한 것으로 사료된다.

문 헌

1. 육창수, 심재호, 류기욱, 김형근, 남준용 : 한약학 II. 광명출판사, 서울, p.394(1992)
2. Douglas, M. and Considine, P. E. : Foods and produ-

- ction encyclopedia. Van Nostrand Reinhold Company, New York, p.1047 (1992)
3. Philips, D. H. : Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, **303**, 468 (1983)
 4. Frak, E. J. and Jersone, J. P. : Introduction to environment toxicology. Elsevier North Holland, p.360 (1978)
 5. Gelbin, H. V. : Benzo(a)pyrene metabolism, activation and carcinogenesis : Role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological Reviews*, **60**, 1107 (1980)
 6. Kim, S. W., Kim, J. P. and Park, S. C. : Effects of some Korean food extracts on *in vitro* benzo(a)pyrene metabolism by rat liver microsomal preparation and its DNA damaging effect. *J. Kor. Cancer Asso.*, **21**, 18 (1989)
 7. Raha, C. R., Gallagher, C. H., Shubik, P. and Peratt, S. : Covalent binding to protein of the K-region oxide of benzo(a)pyrene formed by microsomal incubation. *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 33 (1976)
 8. Okey, A. B., Dube, A. W. and Vella, L. M. : Binding of benzo(a)pyrene and dibenz(a, h)anthracene to the Ah receptor in mouse and rat hepatic cytosols. *Cancer Res.*, **44**, 1426 (1984)
 9. Yun, H. S. and Chang, I. M. : Plants with liver protective activities (Ⅲ). *Kor. J. Pharmacog.*, **10**, 79 (1979)
 10. 中村敏一 : 初代培養 肝細胞 實驗法. 學生出版センター, 東京, p.5 (1987)
 11. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method*, **65**, 55 (1983)
 12. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957)
 13. Berga, L. and Broid, D. : *Sigma Tech. Bull.*, **500**, 60 (1960)
 14. Folch, J., Mee, L. and Stanley, G. S. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)
 15. Kind, P. R. M. and King, E. J. : Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with aminoantipyrine. *J. Clin. Pathol.*, **7**, 322 (1954)
 16. Ott, L. : An introduction to statistical methods and data analysis. PWS publishers, Boston, p.376 (1984)
 17. Croci, T. and Williams, G. M. : Activities of several phase I and phase xenobiotics biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3092 (1985)
 18. Fry, J. R. and Perry, N. K. : The effect of aroclor 1254 pretreatment on the phase I and phase II metabolism of 7-hydroxycoumarin in isolated viable rat kidney cells. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1197 (1981)
 19. Osborne, M. R. and Crosby, N. T. : Benzopyrenes. Cambridge University Press, Cambridge, p.73 (1989)
 20. Wiersma, D. A., Stemmer, P. M. and Roth, R. A. : Influence of red blood cells, serum albumin, and serum lipoproteins on the clearance of benzo(a)pyrene by isolated livers of 3-methylcholanthrene-treated rats. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3433 (1984)
 21. Aarstad, K., Toftguard, R. and Nilsen, O. G. : A comparison of the binding and distribution of benzo(a)pyrene in human and rat serum. *Toxicology*, **47**, 235 (1987)

(1994년 8월 29일 접수)