

Effect of Dietary Monascus Pigment on the Liver Damage Induced with CCl₄ in Rats

Young-Ja Park, Hyeoun-Yeoun Park, Young-Ran Kim, Jeong-Dae Oh and Chong-Guk Yoon[†]

Department of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

In the biological world, there are a number of ecological fights for survival between each organism such as plants, animals and microorganism. In such events, an organism can use its natural bioactive products as defence agent against other organisms. Furthermore, natural bioactive products can be utilized for medicine or functional food. Recently, we investigate the effect of *Monascus* pigment extracted from a fungus, *Monascus anke*, on the alcohol metabolism and blood lipid profile. In the present study, it is observed that *Monascus* pigment supplemented dietary may have a hepatoprotective effect on rat's liver damage induced with CCl₄. By treatment with CCl₄ (3 times, I.P), liver damage was reduced more in the rats fed 2% *Monascus* pigment extract supplemented diet than those fed standard diet, based on the serum levels of alanine aminotransferase, microsomal glucose-6-phosphatase activity and hepatic malondialdehyde content. On the other hand, oxygen free radical generating enzymes, hepatic P-450 dependent aniline hydroxylase, xanthine oxidase, and oxygen free radical scavenging enzymes, hepatic glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase activities were generally higher both in CCl₄ treated group and control fed 2% *Monascus* pigment extract supplemented diet than those fed standard diet. In conclusion, the rats fed 2% *Monascus* pigment extract supplemented diet showed more reduced liver damage than those fed standard diet, which may be due to the acceleration of oxygen free radical metabolism.

Key Words: *Monascus* supplemented diet, CCl₄, Oxygen free radical metabolism

서 론

자연계에서 각 생물들은 상호공존과 항생을 통하여 생태학적 균형을 이루고 있다. 즉 어떤 생물은 다른 생물체의 공격으로부터 자신을 보호하기 위해 생리활성물질을 생산하고 있으며 이들 생리활성물질은 동식물 및 미생물에서 많이 발견되고 있다. 이들은 인간의 질병예방과 치료를 위한 건강보조식품으로 개발되어 이용되고 있다^{41,42}. 홍국은 *Monascus* 속의 곰팡이를 썬 백미에 증식시켜 제조한 홍색의 코지로 polyketide의 일종인 rubropunctatin¹⁷), monascorubrin^{12,22}), rubropunctamine⁹) 및 monascorubramine¹⁸) 등 10여종 이상의 색소성분의 혼합물로 구성되어 있다. 그리고 홍국은 오래 전부터 민간요법으로 사용되어 왔으며¹⁾ *Monascus*속의 monacholin K

가 혈중 cholesterol의 함량저하효과⁷⁾, *Bacillus*, *Streptococcus* 와 *Pseudomonas*속 세균에 대한 항균효과³³⁾, 면역억제효과²⁸⁾, 및 유해산소해독효과⁴²⁾ 등이 보고되었다. 그러나 간 손상에 대한 홍국의 병태 생리적 영향에 관한 연구는 지금까지 접한 바 없다.

한편 최근 산업발전에 따른 산업화학물질의 인체 폭로로 인간의 건강에 심각한 문제가 제기되고 있으며, 특히 화학물질에 의한 간 손상에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{19,24)}. 그러므로 산업화학물질에 의한 간 질환예방 및 치료의 필요성이 요청되고 있으며 이 중 기능성 식품에 의한 간 중독 완화에 대한 연구가 최근 수행되고 있다. 산업화학물질로서 유기용제로 많이 이용되며, 간 독성물질로 알려진 사염화탄소 (CCl₄)²³⁾의 간 손상에 홍국이 어떤 효과가 있는지 검토하는 것은 홍국의 기능성 효과를 검증하는데 의의가 있을 것으로 생각된다.

CCl₄를 실험동물에 투여시 간세포의 간 손상이 야기되며 이는 간세포의 활면소포체에 존재하는 지용성 약물대사에 관여하는 복합산화기구인 cytochrome P450에 의하여 CCl₄가 trichloromethyl radical ($\cdot\text{CCl}_3$)로 변화되며 이 free radical이

*논문 접수: 2003년 8월 18일
수정재접수: 2003년 9월 8일

[†]별책 요청 저자: 윤종국, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, 계명대학교 공중보건학과
Tel: 053-580-5230, Fax: 053-580-5164
e-mail: jky446@kmu.ac.kr

세포상해를 야기시킬 뿐 아니라 이의 연쇄반응에 의하여 생성된 유해산소 역시 $\cdot\text{CCl}_3$ 와 더불어 세포상해를 유발시킨다고 한다³⁸⁾. 그리고 Yu *et al* (2003)은 홍국 첨가식으로 성장시킨 실험동물에서 알콜대사기구가 활성화됨과 동시에 유해산소 해독작용을 관찰하였다. 따라서 식이성 홍국이 CCl_4 대사 및 이에 따른 유해산소 대사에도 영향을 미칠 것이라는 가설을 제시할 수 있다.

이에 본 연구는 홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 CCl_4 를 투여한 다음 간 손상 정도를 확인함과 더불어 이의 기전을 규명하고자 CCl_4 대사에 관여하는 cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) 활성과 유해산소의 생성 및 해독계에 관여하는 효소 활성을 측정하여 이들 실험결과를 상호 비교 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 홍국제조

홍국제조에 사용한 균주는 *Monascus anka* KM 1001이었으며, 배지는 시판백미 (안계황토백미)를 사용했다. 홍국제조는 수분 25%를 함유시켜 증자한 증자백미 300 g에 실험 균주의 포자현탁액 (2.5×10^6 /mL) 10 mL를 접종하여 30°C, 배양습도 89%에서 12일간 재국하여 65°C에서 건조시켜 분말홍국시료를 만들었다.

포자현탁액의 제조는 실험 균주를 potato dextrose agar (PDA) 배지의 시험관에 1백금이 접종하여 28°C에서 사면 배양하여 포자를 충분히 형성시킨 후, 살균된 0.1% Tween 80 용액 5 ml를 넣어 살균된 백금으로 서서히 교반시켜 균사로 부터 포자를 분리시킨다. 같은 방법으로 2회 포자를 분리시킨 후, 약간의 균사가 함유된 포자현탁액을 격렬하게 진탕시켜 균사와 포자를 완전히 유리시켜 살균된 탈지면으로 여과하여 균사를 제거한다. 이 포자현탁액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 포자를 침전시킨다. 침전된 포자를 멸균수로 씻은 다음, 20% glycerol 용액으로 포자수가 2.5×10^6 spores/ml되게 포자현탁액을 조제하였다. 포자현탁액은 -73°C에서 보관하면서 사용하였다.

2. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 생후 6주령 된 체중 200 ± 10 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 웅성 흰쥐를 대한실험동물센터로부터 구입한 후 동물사료 (삼양사 제품)로 사육실 (온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 및 습도 $50 \pm 5\%$)에서 1주일 적응시켰다. 실험동물은 각각 7마리씩 성장식이군, 사염화탄소 투여군 (이하 CCl_4 라 함), 2% 홍국 첨가식이군, 2% 홍국 첨가식으로 성장한 다음 CCl_4 투여군, 4% 홍국 첨가식이군, 4% 홍국 첨가식으로 성장한 다음 CCl_4 투여군으로 분리하여 수용하였다. 홍국은 사

료 100 g당 2% 및 4%를 첨가시켜 1개월간 실험동물의 사료로 사용하였으며 실험동물의 체중측정은 성장기간동안 3일마다 같은 시간에 동일한 계측기로 측정하였다. 이때 홍국을 첨가시키지 않은 사료로 성장시킨 군을 정상식이군으로 하였다. CCl_4 투여는 홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 CCl_4 를 olive oil과 1:1혼합액을 만들어 체중 100 g 당 0.1 ml씩 처치 3일 전부터 1일 1회, 1일 간격으로 3회 복강으로 투여하였고, 이때 대조군은 동량의 olive oil을 복강 투여하였으며, 모든 실험군은 처치 24시간 전부터 물만 공급하고 금식시킨 후 처치하였다.

동물의 처치는 효소 활성도의 일 중 변동을 고려하여 일정 시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였으며 ether 마취 하에 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시킨 후, 4°C 생리식염수로 간을 관류시켜 간 조직 내에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 다음 여지로 압박하여 간 조직 내 남아 있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음, 무게를 칭량하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정에 사용하였다. 이때 PMF 분획은 microsomal 및 cytosolic 분획에 준하여 실험에 사용하였다.

3. 효소원의 조제

적출한 간 조직 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 빙냉 하에 glass teflon homogenizer로 마쇄균질액 (20% w/v)을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리한 다음 핵 및 미마쇄부분을 제거한 후 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액의 일부는 postmitochondria (PMF) 분획으로 분리하였다.

4. 효소 활성도 측정

1) 혈청 Alanine aminotransferase (ALT) 활성도 측정
L-alanine과 α -ketoglutaric acid를 기질로 하여 효소시료와 함께 37°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 pyruvic acid를 alkali 조건에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 반응시켜 발색되는 색조를 비색 정량하는 Reitman과 Frankel의 방법³²⁾에 따라 조제된 kit 시액을 사용하였다. 활성도 단위는 혈청 ml 당 Karmen 단위²⁰⁾로 표시하였다.

2) Microsomal cytochrom P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) 활성도 측정

간 조직 중 CYPdAH 활성도는 aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시켜 유리되는 *p*-aminophenol을 phenol 시약으로 발색시켜 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowery의 방법³⁾에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기

질로부터 생성된 p -aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다.

3) Catalase (CAT) 활성도 측정

간 조직 중 mitochondria 분획의 catalase 활성도 측정은 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 기질로 하여 환원되는 정도를 240 nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수 ($0.041 \text{ nm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi의 방법²⁾에 준하였다. 활성도 단위는 간 조직 효소액 중에 함유된 단백 1 mg이 1분 동안에 반응하여 분해시킨 H_2O_2 량을 nmole로 표시하였다.

4) Cytosolic glucose-6-phosphatase (G-6-Pase)

간 조직 중 G-6-Pase의 활성도는 Hasumura, Tescke, Lieber의 방법¹⁵⁾에 따라 측정하였다.

Glucose-6-phosphatase를 기질로 하여 30°C에서 20분간 반응시켜 유리되는 inorganic phosphorus를 Fiske, Subbarow의 방법⁸⁾에 따라 발색시킨 다음 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1 mg이 20분간 반응하여 생성되는 phosphorus의 양을 nmole로 표시하였다.

5) Cytosolic glutathione S-transferase (GST) 활성도 측정

간 조직 GST의 활성도 측정은 Habig 등의 방법¹¹⁾에 준하였다. 즉 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25°C에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340 nm에서 그 흡광도의 변화를 읽고 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 나타내었다.

6) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

간 조직의 세포질 중 SOD 활성도 측정은 hematoxylin 자동산화의 억제 정도를 관찰하는 Martin 등의 방법²⁷⁾에 준해 0.1 mM EDTA 함유된 50 mM K.P. buffer (pH 7.5)에 10 μM hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 he-

matein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 액중의 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 단백질의 양으로 나타내었다.

7) Xanthine oxidase (XO) 활성도 측정

간 및 혈청 중 XO 활성도 측정은 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid에 phosphotungstic acid를 가하여 710 nm에서 비색정량하는 Yoon의 방법³⁷⁾에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성시킨 uric acid의 양을 혈청 1리터당 μmole 로 표시하였다.

5. 간 조직의 glutathione (GSH) 함량 측정

간 조직의 GSH 함량은 Ellman의 방법⁶⁾에 따라 측정하였다. 조직 마쇄균질액 일정량에 4% sulfosalic acid를 가해 원심분리한 후, 상층액 일정량을 0.1 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 p -nitrothiophenol을 측정하였다. GSH 함량은 조직 g당 μmole 로 표시하였다.

6. 간 조직의 thiobarbiturate-reacted substance (TRS) 함량 측정

간 조직 중 지질 과산화물 함량은 Ohkawa 등의 방법³⁰⁾에 준하였다. 즉 효소 시료 속의 과산화지질을 산성 조건하에서 thiobarbituric acid와 가열 반응시켜 생긴 물질을 532 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. TRS 함량은 간 조직 g당 nmole로 표시하였다.

7. 간 조직 중 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법²⁶⁾에 준해 bovine serum

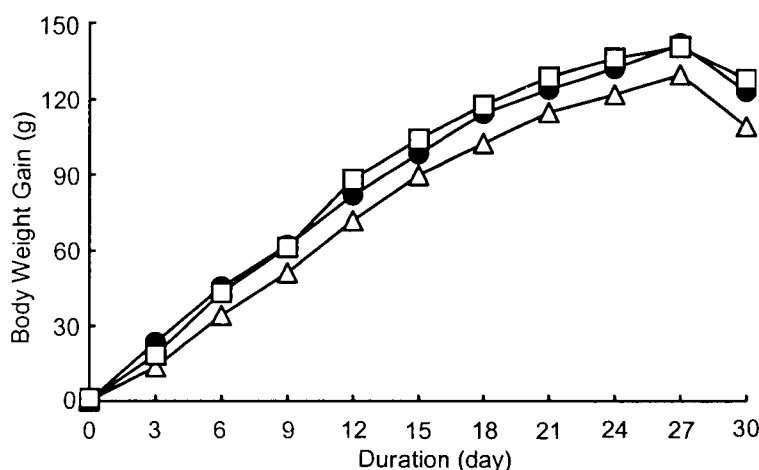


Fig. 1. Body weight gains of rats. Each value represents the mean of 14 rats. ●-●: Normal, △-△: 2% *Monascus*, □-□: 4% *Monascus*. No significant difference between each group.

albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

8. 실험결과 검증

실험성적의 통계처리는 Student's t-test³⁴⁾로 하였으며 유의 수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 성장기간 동안 실험동물의 체중변동

홍국 첨가식으로 체중 200 g 내외의 흰쥐를 1개월간 성장시키는 동안 체중 증가율을 나타낸 것이 Fig. 1과 같다.

2% 홍국 첨가식이군은 정상식이군 및 4% 홍국 첨가식으로 성장한 실험군에 비해 체중 증가율이 낮게 나타내는 경향을 보였으며, 정상식이군과 4% 홍국 첨가식이군 간에는 체중 증가율이 별다른 차이가 없었다.

2. 식이성 홍국이 간 상해에 미치는 영향

본 실험에서 사용한 식이 중 홍국이 간 조직에 어떠한 병태 생리적인 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 체중 당 간 무게, thiobabutaricacid 반응물질, 혈청 중 ALT 및 간세포의 microsomal G-6-Pase 활성을 측정하였다 Table 1과 같다.

급성 간 손상시 증가된다는 체중당 간 무게 및 간 조직의

TRS 함량³⁹⁾은 홍국 첨가식이군 (2%, 4% 홍국 첨가식이군)과 정상식이군간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다.

그러나 혈청 ALT 활성은 2% 및 4% 홍국 첨가식이군은 정상식이군에 비해서 각각 30% 및 55% 증가되었으나 통계학적인 의의는 없었다. 그리고 간 조직 microsomal G-6-Pase 활성은 2% 및 4% 홍국 첨가식이군이 정상식이군에 비하여 각각 33% 및 27% 증가되었다.

3. 홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 CCl₄ 투여가 간 손상에 미치는 영향

홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 CCl₄ 투여시 CCl₄ 투여가 간 상해에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 체중 당 간 무게, TRS 및 혈청 ALT 및 간 조직의 microsomal G-6-Pase의 활성을 나타낸 것이 Table 2와 같다.

CCl₄ 투여로 인한 체중당 간 무게 증가율은 정상식이군에서는 23%의 유의한 ($P<0.001$) 증가를 보였으며 2% 및 4% 홍국 첨가식이군은 각각 22% ($P<0.001$), 20% ($P<0.001$) 증가되어 홍국 첨가식이군 모두 체중 당 간 무게가 정상식이군에 비하여 다소 증가되는 경향을 볼 수 없었다.

과산화지질인 TRS 함량에 있어서는 정상식이군에서는 CCl₄ 투여로 인하여 109%의 유의한 ($P<0.001$) 증가를 보였으며 2% 홍국 첨가식이군은 19% 증가되었으나 4% 홍국 첨

Table 1. Effect of dietary *Monascus* extract on the liver pathophysiological condition in rats

Markers of liver injury	Normal	2% <i>Monascus</i>	4% <i>Monascus</i>
LW/BW (%)	2.78±0.08	2.68±0.06	2.87±0.10
TRS ¹⁾	5.64±0.51	6.51±0.59	5.96±0.61
Serum ALT ²⁾	22.50±4.43	29.17±8.65	35.00±6.66
Hepatic G-6-Pase ³⁾	4.03±0.39	5.36±0.69	5.10±0.48

Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.

Unit: ¹⁾nmole MDA/g of liver tissue, ²⁾Karmen unit/min/ml of serum, ³⁾nmole pi/min/mg protein.

No significant difference between each group

Table 2. Effect of dietary *Monascus* extract in the liver weight/body weight (LW/BW%), thiobarbiturate-reacted substance (TRS), serum levels of alanine aminotransferase activity (ALT) and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) activities in CCl₄-treated rats

Markers of liver injury	Normal		2% <i>Monascus</i>		4% <i>Monascus</i>	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
LW/BW (%)	2.68±0.06	3.30±0.07 ^{***b)}	2.78±0.08	3.41±0.04 ^{***b)}	2.87±0.10	3.46±0.05 ^{***b)***c)}
TRS ¹⁾	5.64±0.51	11.79±1.20 ^{***b)}	6.51±0.59	7.76±0.92 ^{*c)}	5.96±0.61	6.12±0.82 ^{**c)}
Serum ALT ²⁾	22.50±4.43	86.67±10.87 ^{***b)}	29.17±8.65	48.33±8.08 ^{*c)}	35.00±6.66	56.67±6.17 ^{b)***c)}
Hepatic G-6-Pase ³⁾	4.03±0.39	2.52±0.27 ^{**b)}	5.36±0.69	3.74±0.37 ^{*c)}	5.10±0.48	3.46±0.37 ^{*b)}

Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.

Unit: ¹⁾nmole MDA/g of liver tissue, ²⁾Karmen unit/min/ml of serum, ³⁾nmole pi/min/mg protein.

^{b)}significantly different from each control group,

^{c)}significantly different from normal group treated with CCl₄ (*; $P<0.05$, **; $P<0.01$, ***; $P<0.001$)

Table 3. Effect of dietary *Monascus* extract on the hepatic oxygen free radical generating enzymes activities in CCl₄-treated rats

Enzymes	Normal		2% <i>Monascus</i>		4% <i>Monascus</i>	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
CYPdAH ¹⁾	3.48±0.38	0.84±0.11 ^{***b)}	4.38±0.57	0.81±0.10 ^{***b)}	3.42±0.36	0.84±0.16 ^{***b)}
XO ²⁾	3.17±0.22	2.30±0.42	3.33±0.20	2.74±0.30	3.58±0.47	2.76±0.75

Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.
Unit: ¹⁾p-aminophenol nmoles/hr/mg protein, ²⁾nmoles uric acid/min/mg protein.
^{b)}significantly different from each control group (^{***}; P<0.001)

Table 4. Effect of dietary *Monascus* extract on the hepatic oxygen free radical scavenging enzymes activities in CCl₄-treated rats

Enzymes	Normal		2% <i>Monascus</i>		4% <i>Monascus</i>	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
GST ¹⁾	736.78±59.55	681.76±54.75	812.05±75.15	659.05±62.50	715.98±68.79	646.66±60.19
Catalase ²⁾	24.85±2.49	37.54±2.19 ^{**b)}	37.53±3.15 ^{a)}	42.85±4.35	35.71±2.70 ^{a)}	42.48±3.44
SOD ³⁾	78.61±7.25	90.82±8.96	90.60±9.48	103.19±9.98	61.78±5.76	78.04±6.95

Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.
Unit: ¹⁾nmoles 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate/min/mg protein, ²⁾reduced H₂O₂ nmoles/min/mg protein, ³⁾50% inhibition of autoxidation of hematoxylin/min/mg protein.
^{a)}significantly different from normal control group, ^{b)}significantly different from each control group (*; P<0.05, **; P<0.01)

Table 5. Effect of dietary *Monascus* extract on the hepatic contents of glutathione in CCl₄-treated rats

Enzymes	Normal		2% <i>Monascus</i>		4% <i>Monascus</i>	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
GSH ¹⁾	2.71±0.17	3.44±0.29	2.60±0.18	3.75±0.28 ^{**b)}	2.79±0.28	3.73±0.41

Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.
Unit: ¹⁾μmoles/g of tissue, ^{b)}significantly different from each control group (**; P<0.01)

가식이군은 대조군에 비하여 별다른 증가를 보이지 않았다.

한편 CCl₄ 투여로 인한 혈청 ALT 활성 증가율은 정상식이군에서는 약 3.8배의 현저한 증가를 (P<0.001) 보였으며, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군은 각각 약 1.66배 (P<0.05), 약 1.62배 (P<0.05)로 증가되었다. 따라서 홍국 첨가식이군이 정상식이군보다 CCl₄ 투여로 인한 혈청 ALT 활성 증가율이 낮게 나타났다. 그리고 홍국 첨가식이군 중 혈청 ALT 활성 증가율은 2% 홍국 첨가식이군이 4% 홍국 첨가식이군 보다 낮게 나타났다.

CCl₄ 투여로 인한 간 조직 microsomal G-6-Pase는 정상식이군은 대조군에 대한 활성 감소율은 약 37%의 유의한 감소 (P<0.01)를 보였으며 2% 홍국 첨가식이군은 30% 유의하게 감소되었으나 통계학적인 의의는 없었다. 그러나 4% 홍국 첨가식이군은 대조군에 비하여 약 32% 유의한 (P<0.05) 감소를 보였다.

4. 홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 있어서 CCl₄ 투여시 유해산소 생성 및 해독 효소 활성

본 실험에서 xenobiotics의 phase I 대사에 관여하는 CYP의 활성인 CYPdAH 활성이 2% 홍국 첨가식이군이 정상식이군보다 약 26% 증가되었다. 그러나 4% 홍국 첨가식이군은 정상식이군간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다.

2% 홍국 첨가식이군에서 간 조직 중 GST, catalase 및 SOD 활성은 정상식이군에 비하여 각각 10%, 5% (P<0.05) 및 15% 증가되었으며 4% 홍국 첨가식이군에 비해서는 GST 활성은 13%, SOD 활성은 47% 증가되었다.

5. 유해산소 해독에 관여하는 간 조직 중 GSH 함량변동

본 실험조건에서 대조군에 대한 GSH 함량 증가율에 있어서는 2% 홍국 첨가식이군이 44% (P<0.01)인데 비하여 정상식이군에서는 27% 증가되어 2% 홍국 첨가식이군이 정상식

이군보다 GSH 함량 증가율이 높게 나타났다. 또한 4% 홍국 첨가식이군에 있어서 GSH 함량 증가율이 34%로서 정상식이군보다는 다소 높게 나타났으나 2% 홍국 첨가식이군보다는 다소 낮게 나타났다.

고 찰

본 실험에서 표준식이와 홍국 2%, 4% 첨가식으로 흰쥐를 1개월간 성장시키는 동안 체중 증가율을 세 군간에는 별다른 차이를 나타내지 않았으며, 또한 간 손상의 지표로 이용되는 체중 당 간 무게, 간 조직 중 TRS 함량 및 혈청 중 ALT^{39,40)}와 간 조직의 microsomal G-6-Pase 활성²¹⁾ 역시 세 군간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다. 따라서 식이 중 2% 및 4% 첨가식으로 실험동물을 사육한 경우 간 손상에는 별다른 차이가 없음을 알 수 있다. 따라서 식이에 2%, 4% 홍국을 첨가시키는 경우 실험동물의 생체 내에는 별다른 독성작용을 나타내지 않음을 확인할 수 있다. 이러한 실험동물에 CCl₄를 3회 투여시 체중 당 간 무게, 간 조직 중 TRS 함량 및 혈청 중 ALT 활성의 대조군 대한 증가율과 간 상해시 감소된다는 간 조직 중 microsomal G-6-Pase²¹⁾ 감소율이 2% 홍국 첨가식이군이 4% 홍국 첨가식이군 및 표준식이군 비하여 감소되었다. 이러한 실험결과는 CCl₄에 대한 간 손상이 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군보다 경미하게 나타남을 시사해 주고 있다. CCl₄는 체내 세포의 SER에 존재하는 mixed function oxidase인 cytochrome P450 monooxygenase에 의하여 trichloromethyl free radical ($\cdot\text{CCl}_3$)로 전환되며, 이어 chloroform, HCOOH를 거쳐 CO₂로 되어 체외로 배설되는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 일반적으로 CCl₄를 생체에 투여시 cytochrome P450이 불활성화되어 이의 활성인 CYPdAH 활성이 감소되며 CYPdAH 감소율에 비례해서 CCl₄의 대사율이 오히려 증가된다고 한다^{16,29)}. 그리고 CCl₄ 대사 중 대사중간 생성물질인 $\cdot\text{CCl}_3$ 는 조직세포의 손상을 야기시키는 것으로 알려져 있다³¹⁾.

본 연구에서 cytochrome P450의 활성인 CYPdAH 활성에 있어서 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이 및 4% 홍국 첨가식이군 보다 높게 나타났다. 이는 2% 홍국 첨가식이군에서 CCl₄의 $\cdot\text{CCl}_3$ 로의 대사를 촉진시킴을 의미하며, 또한 본 실험에서 실험동물에 투여한 경우에는 대조군에 대한 본 효소 활성의 감소율이 2% 홍국 첨가식이군에서 표준식이 및 4% 홍국 첨가식이군 보다 높게 나타났다. 이와 같은 실험결과는 2% 홍국 첨가식이군에서 CCl₄의 대사율이 증가됨을 시사해 주고 있다. 따라서 2% 홍국 첨가식이군에서 CCl₄에 의한 간 손상이 경미하게 나타남은 CCl₄ 대사 촉진에 기인되기 때문일 것으로 생각된다.

일반적으로 xenobiotics 대사시에 연쇄적으로 oxygen free

radical이 생성되는 것으로 알려져 있다. 특히 Yoon 등은³⁸⁾ 실험동물에 CCl₄ 투여시 간 손상이 trichloromethyl free radical과 더불어 oxygen free radical에 의해서도 야기된다고 보고하였다. 이러한 사실에 근거하여 본 실험조건에서 oxygen free radical 생성에 관여하는 XO 활성과 CYPdAH 활성을 간 조직 중에서 측정한 결과 2% 홍국 첨가식이군에서 CYPdAH 활성이 4% 홍국 첨가식이군 및 표준식이군보다 증가되는 경향을 보였으나 CCl₄ 투여시 CYPdAH 및 XO 활성은 세 군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다. 따라서 홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 CCl₄ 투여시 oxygen free radical 생성에 관여하는 CYPdAH 및 XO 활성은 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군 간에는 별다른 차이가 나타나지 않음을 알 수 있다.

일반적으로 oxygen free radical에 의한 조직세포의 상해는 oxygen free radical 생성효소기구와 해독 효소기구간의 불균형에 따라서 야기된다고 한다^{4,25)}. 그러므로 본 실험조건에서 oxygen free radical 생성에 관여하는 CYPdAH 및 XO 활성에 의한 영향보다는 oxygen free radical 해독효소 활성에 의한 세포상해 영향이 클 것으로 생각되어 항산화효소인 GST, catalase 및 SOD 활성^{2,11,13,14)}을 본 실험조건에서 측정하였다. 2% 홍국 첨가식이군에서 간 조직 중 GST, catalase 및 SOD 활성이 정상군 및 4% 홍국 첨가식이군에서 증가되었으며 이는 Yu 등의 보고⁴²⁾와 유사하였다. 이러한 실험결과로 보아서 2% 홍국 첨가식이군에서 항산화효소의 유도 잠재가능성이 있을 것으로 생각된다. 특히 CCl₄ 투여한 경우에 있어서도 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군에 비해서 이들 항산화효소 활성이 대체적으로 증가되는 경향을 보였다.

이러한 실험결과로 보아 2% 홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 있어서 CCl₄ 대사 연쇄반응에 생성된 oxygen free radical의 해독기능이 촉진될 가능성이 있는 것으로 생각된다.

한편 생체 내 CCl₄ 투여시 CCl₄ 대사의 중간생성물질인 $\cdot\text{CCl}_3$ 및 oxygen free radical은 GSH에 의해서 해독되는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 그리고 생체 내 xenobiotics 급성 투여시 짧은 시간 내에는 GSH가 소모되지만 24시간 이후에는 GSH 함량이 오히려 증가되는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 본 실험조건에서 CCl₄ 투여로 인하여 대조군에 대한 GSH 함량 증가율에 있어서는 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군 보다 높게 나타났다. 따라서 2% 홍국 첨가식이군에서 oxygen free radical 해독력이 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

이상 모든 실험결과를 종합해 볼 때 식이 중 적당량의 홍국첨가는 CCl₄와 같은 xenobiotics에 의한 간 손상을 경감시키며 이는 CCl₄ 대사 및 oxygen free radical의 해독이 촉진되어 나타나기 때문일 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 류미라 (1998): 홍국소체에 관한 최근의 동향. 식품산업과 영양, **3(2)**: 42-46.
- 2) Aebi H (1974): Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2, Catalase. Academic Press, New York.
- 3) Bidlack WR and Lowery GL (1982): Multiple drug metabolism: *p*-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol*, **31**: 311-317.
- 4) Chow CK and Tapple AL (1974): Responses of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J Nutr*, **104**: 444-451.
- 5) Dahm LJ and Jones DP (1996): Mechanism of chemically induced liver disease. pp. 882-884. In "Hepatology" (Zakim D and Boyer TD eds.), Saunders, Philadelphia.
- 6) Ellman GL (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry and Biophysics*, **82**: 70-77.
- 7) Endo A (1980): Monacolin K a new hypochloesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme a reductase. *J Antibiot*, **33**: 334-336.
- 8) Fiske CH and Subbarow Y (1925): The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry*, **66**: 375-400.
- 9) Fowell ADG, Robertson A and Whelley WB (1956): Monascorubramine. *J Chem Soc Special Publ*, **5**: 27-34.
- 10) Fridovich I (1979): Superoxide and superoxide dismutases. pp 67-90. In "Advances in Inorganic Biochemistry" (Eichhorn GL and Marzilli DL eds.). Am. Elsevier, New York.
- 11) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid and formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249(22)**: 7130-7139.
- 12) Hadfield JR, Holker JSE and Stanway DN (1967): The biosynthesis of fungal metabolites. Part II. *J Chem Soc*, **19**: 751-754.
- 13) Halliwell B (1975): Hydroxylation of *p*-coumaric acid by illuminated chloroplasts: The role of superoxide. *Eur J Biochem*, **55**: 355-360.
- 14) Halliwell B (1978): Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep*, **2**: 113-128.
- 15) Hasumura Y, Teschke R and Lieber CS (1974): Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its mechanism, after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, **66**: 415-422.
- 16) Haugen DA and Coon MJ (1976): Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β -naphtho flavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem*, **251**: 7929-7939.
- 17) Haws T, Shima T, Isobe A and Kimura S (1975): Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. *J Jap Soc Food Nutri*, **28**: 497-502.
- 18) Hiroi T, Shima T, Isobe A and Kimura S (1975): Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. *J Jap Soc Food Nutri*, **28**: 497-502.
- 19) Jeon TW, Lee SI and Yoon CG (2000): Effect of cyclohexane on the lung toxicity in rats. *The Korea Journal of Biomedical Laboratory Sciences*, **6(4)**: 245-251.
- 20) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *Journal of Clinical Investigation*, **34**: 131-133.
- 21) Kim BR and Yoon CG (2003): Effect of cyclohexane treatment on the liver cytochrome P-450 dependent aniline hydroxylase activity in alcohol-pretreated rats. *Korea Journal of Environmental Health*, **29(2)**: 23-28.
- 22) Kurono M, Nakanishi K, Shindo K and Tada M (1963): Biosynthesis of monascorubrin and monascoflavin. *Chem Pharm Bull*, **11**: 359-362.
- 23) Lee HJ, Cho HG and Yoon CG (1999): Effect of CCl₄-induced liver damage on the metabolism of xylene in rats. *Korea Journal of Environmental Health*, **25(1)**: 102-108.
- 24) Lee SH, Jeon TW and Yoon CG. (2000): A study on the effect of injection frequency on the liver damage in rats. *The Korea Journal of Biomedical Laboratory Sciences*, **6(1)**: 29-36.
- 25) Leibovitz BE and Siegel BV (1980): Aspects of free radical reaction in biological system: aging. *J Gerontol*, **35**: 45-56.
- 26) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 27) Martin JPJ, Dailey M and Sugarman E (1987): Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Archives Biochemistry and Biophysics*, **255(2)**: 329-336.
- 28) Martinkova L, Juzlova P and Vesely D (1995): Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J Appl Bacteriol*, **79**: 609-616.
- 29) Noguchi T, Fong KL, Lai EK and Alexander SS (1982): Specificity of phenobarbital induced cytochrome P-450 for metabolism of CCl₄ to the trichloromethyl radical. *Biochem Pharmacol*, **31**: 615-624.
- 30) Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K (1979): Assay for lipid peroxide

- xides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **95(2)**: 351-358.
- 31) Recknagel RO, Glende E and Hruszkewycz AM (1977): New data supporting an obligatory role for lipid peroxidation in CCl₄-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose-6-phosphatase. In "Biological reactive intermediates: Formation, toxicity and inactivation" (Jollow DJ, Kocsis JJ, Snyder R, Vainio H eds.), Plenum press, New York.
- 32) Reitman S and Frankel S (1957): A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin pathol*, **28**: 50-63.
- 33) Robinson JA (1991): Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Phil Trans R Soc Lond B*, **332**: 107-114.
- 34) Scheffler WC (1980): Statistics for: the Biological Sciences. London: Addison-Wesley Publishing Co.
- 35) Toftgard R and Gustafsson SA (1980): Metabolic pathway of carbon tetrachloride. A review. *Scand J Work Environ Health* **6**: 7.
- 36) Wislocki PG, Miwa GT and Lu AH (1980): Reactions catalyzed by the cytochrom P-450 system. pp. 134-138. In "Enzymatic basis of detoxication" (Jakoby WB eds.), Academic press, New York.
- 37) Yoon CG (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal (Keimyung Junior College)*, **2**: 295-308.
- 38) Yoon CG, Lee MK and Lee SI (1998): Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl₄-treated rats. *Kor J Gerontol*, **8(1)**: 35-42.
- 39) Yoon CG, Lee SI and Shin JK (1991): Effect of carbon tetrachloride on the changes of xanthine oxidase activity in rats previously fed low or high protein diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **20**: 527-537.
- 40) Yoon CG, Shin JK and Chung KS (1991): An effect of carbon tetrachloride treatment on the activity of small intestinal and hepatic alanine aminotransferase in rats. *J Inst Nat Sci*, **10(2)**: 209-214.
- 41) Yu TS, Choi HJ and Yoon CH (2003): Effect of Monascus pigment extract on the alcohol Metabolism in rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **32(4)**: 244-249.
- 42) Yu TS, Kim HH and Yoon CH (2003): Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **32(2)**: 244-249.
-