

식이성 홍국이 Bromobenzene에 의한 간 손상의 해독에 미치는 영향

오정대¹ · 윤종국^{1*} · 유대식²

¹계명대학교 공중보건학과

²계명대학교 미생물학과

Effect of Dietary *Monascus* Koji on the Liver Damage Induced by Bromobenzene in Rats

Jung-Dae Oh¹, Chong-Guk Yoon^{1*} and Tae-Shick Yu²

¹Dept. of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Dept. of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

In the present study, it is observed that *Monascus* diet may have a hepatoprotective effect on the liver damage induced by bromobenzene in rats. By treatment with bromobenzene (400 mg/kg, *i.p.*) once a day for 3 consecutive days, the liver damage was reduced in rats fed 2% *Monascus* diet, based on the liver functional and histopathological findings. Furthermore, retreatment of bromobenzene to the animals with damaged liver showed higher decreasing rate of hepatic glutathione content and increasing rate of cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase activity at 4 h in rats fed 2% *Monascus* diet than those fed STD diet, and V_{max} in glutathione S-transferase was higher in liver of rats fed 2% *Monascus* diet than those fed STD diet. On the other hand, activities of antioxidant enzymes such as hepatic glutathione S-transferase, catalase and superoxide dismutase were generally higher both in bromobenzene and 2% *Monascus* diet treated group than those fed STD diet. In conclusion, the rats fed 2% *Monascus* diet showed lower liver damage than those fed STD diet, which may be due to the acceleration of bromobenzene metabolism and detoxication of oxygen free radicals.

Key words: *Monascus* koji supplemented diet, bromobenzene, oxygen free radical metabolism

서론

자연계에서 각 생물들은 상호공존과 항생(抗生)을 통하여 생태학적 균형을 이루고 있다. 즉, 어떤 생물은 다른 생물체의 공격으로부터 자신을 보호하기 위해 생리활성물질을 생산하는데, 이들 생리활성물질들은 식물 및 미생물에서 많이 발견되고 있다

최근 경제발전과 더불어 국민소득의 향상으로 건강에 대한 관심이 날로 고조되고 있으며 이와 관련하여 건강보조 식품으로서 기능성 식품에 대한 관심이 증가되고 있다. 이들 기능성 식품 중에는 알코올의 대사 촉진(1)과 유해산소의 독성을 완화시키는 등(2) 여러 가지 기능을 가진 제품들이 개발·시판되고 있다.

*Monascus*속 곰팡이 중 붉은 색소를 생산하여 진한 홍색을 띠는 홍국(紅麴)은 찰 백미에 곰팡이를 증식시켜 제조한 홍색 코지로서, polyketide의 일종인 rubropunctatin(3), monascorubrin(4), rubropunctamine(5) 및 monascorubramine(6) 등 10여종 이상의 색소 성분으로 구성된 혼합물이다. 홍국

은 약 600년 전부터 식품으로서 뿐만 아니라 천연 착색료로 이용되어 왔으며, 특히 중국 남부 지역이나 대만에서는 알코올 생산 능력과 단(甘)향이 강하고 착향성이 뛰어난 특징 때문에 양조용 착색·착향료로서 술, 홍유부, 고기 및 야채 절임 등의 제조에 많이 이용하였다(7). 또한 *Monascus*속의 *M. ruber*의 배양액에서 발견한 monacholin K는 혈중 콜레스테롤 저하효과(8), *Bacillus*, *Streptococcus*와 *Pseudomonas*속 균에 대한 항균 효과(9), 면역증진 효과(10) 및 유해산소 해독 효과(1) 등을 나타나는 것으로 보고되었다. 그러나 지금까지 알려진 간 손상에 대한 생화학적 및 병태 생리적 연구는 접한 바 없다.

한편 산업의 발달로 산업화학 물질인 xenobiotics가 널리 사용됨에 따라 이들이 인체에 폭로시 건강에 많은 중독증상이 나타나고 있는데, 이러한 중독현상의 정도는 인체의 생리적 및 식이적 조건 등에 따라 많은 영향을 받고 있는 것으로 알려져 있다(11). Xenobiotics 일종인 bromobenzene은 산업체에서 유기용제로 많이 사용하고 있는데, 이 물질은 생체내에서 간 세포의 다기능 복합산화효소기구에 의하여 친전자

*Corresponding author. E-mail: jky446@kmu.ac.kr

Phone: 82-53-580-5230, Fax: 82-53-580-5164

성 물질인 bromobenzene-3, 4-oxide로 전환되어, 간 세포의 상해를 유발시키며(12) 해독효소인 glutathione S-transferase (GST)에 의하여 glutathione(GSH)과 결합한 후 배설되는 것으로 알려져 있다(13,14).

이에 본 연구에서는 bromobenzene에 의한 간 손상에 홍국 성분이 어떠한 영향을 미치는지를 검토하고자 bromobenzene 대사에 관여하는 cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase(CYPdAH) 활성과 유해산소의 생성 및 해독에 관여하는 효소의 활성을 측정하여 상호 비교·검토함으로써 홍국의 기능성 연구에 대한 기초자료로 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

홍국 제조

홍국 제조는 증자한 백미(안계 황토백미) 300 g에 *Monascus* KM 1001 포자 현탁액(2.5×10^6 /mL) 10 mL를 접종하고 30°C, 습도 89%에서 12일간 재국한 후 65°C에서 건조시켜 분말로 홍국 시료를 만들었다.

포자 현탁액의 제조는 potato dextrose agar(PDA) 배지의 시험관에 균주 1백금이를 접종하고 28°C에서 사면 배양하여 포자를 충분히 형성시킨 후 0.1% Tween 80 용액 5 mL를 가하여 백금으로 서서히 교반시켜 균사로부터 포자를 분리하였다. 동일한 방법으로 2회 포자를 분리한 후 약간의 균사가 함유된 포자 현탁액을 격렬하게 진탕하여 균사와 포자를 완전 분리시킨 다음 탈지면으로 여과하여 균사를 제거하였다. 포자 현탁액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 포자를 침전시켜 멸균수로 수세한 후 20% glycerol 용액으로 2.5×10^6 spores/mL 되도록 포자 현탁액을 조제하여 -73°C에 보관하면서 사용하였다.

동물 및 처치

실험동물은 체중 200 ± 10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 대한동물실험센터(음성, 한국)로부터 구입한 후 본 대학 사육실(온도: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도: $50 \pm 5\%$)에서 1주일간 적응시킨 다음 1군당 6마리씩 총 6군으로 나누어 실험에 사용하였다. 실험군은 표준식이군, bromobenzene 투여군, 2% 홍국 첨가식이군, 2% 홍국 첨가식이 후 bromobenzene 투여군, 4% 홍국 첨가식이군, 4% 홍국 첨가식이 후 bromobenzene 투여군으로 분리·수용하여 4주간 사육하였다. Bromobenzene은 체중 1 kg당 400 mg을 1일 1회 3일간 복강으로 투여하였으며, 24시간 후에 bromobenzene을 재투여한 후 4시간 후에 처치하였다.

실험동물은 일정시간에 에테르 마취하에 개복한 후 복부 대동맥에서 채혈하여 실험사시킨 후 문맥을 통해 4°C 생리 식염수로 간으로 관류하여 조직내에 남아 있는 혈액을 제거 후 간장을 적출하였고 적출된 간장은 생리식염수로 씻은 후 장기 내에 남아있는 생리식염수를 제거한 다음 무게를 측정하였다. 혈액은 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 15분

간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) 활성 측정에 사용하였다. 또한 적출한 간장의 일부를 고정액으로 고정시켜 조직학적 검사에 사용하였다.

효소시료의 조제

적출한 간 조직 일정량에 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20%(w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획과 post-mitochondria 분획(PMF)을 얻었다. Mitochondria 분획은 catalase(CAT) 활성 측정에 사용하였으며 PMF는 CYPdAH, glucose-6-phosphatase(G6Pase), glutathione peroxidase(GPx), GST, superoxidase dismutase(SOD) 및 xanthine oxidase(XO) 활성 측정용 시료로 하였다.

혈청중 ALT 및 AST 활성 측정

ALT의 활성은 Reitman-Frankel(15)의 방법에 준해 제조된 kit 시약을 사용하였다. 활성도 단위는 혈청 mL당 Karmen unit(16)로 표시하였다.

간조직중 항산화효소, 항산화 물질 및 단백질 함량 측정 간 조직 중 mitochondria 분획의 CAT 활성은 Aebi(17)의 방법, CYPdAH 활성은 Bidlack과 Lowery(18)의 방법, GPx 활성은 Paglia과 Valentine(19)의 방법, GST 활성은 Habig 등(20)의 방법, SOD 활성은 Martin 등(21)의 방법 및 XO 활성은 Yoon(22)의 방법, G6Pase 활성은 Hasumura 등(23) 및 Fiske와 Subbarow(24)에 준하여 측정하였다.

한편, 지질과산화물 함량은 Ohkawa 등(25)의 방법, GSH 함량은 Ellman(26)의 방법에 준하여 측정하였으며 효소단위에 필요한 간조직 시료중 단백질 함량은 Lowry 등(27)의 방법에 따라 bovine albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

광학현미경 관찰

조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위해 적출 즉시 간 조직의 일부분을 10% neutral buffered formalin액에 고정하고 고정이 끝난 조직을 흐르는 물에 수세한 후 순차적으로 증가되는 농도 순서에 따라 알코올로 탈수하여 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직을 4 μm 두께로 절편한 다음 hematoxylin-eosin 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

실험결과의 통계처리

실험결과의 통계처리는 student's t-test(28)를 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 표시하였고, 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

체중 증가율

홍국첨가 식이로 흰쥐를 1개월간 사육하는 동안의 체중 증

가율은 Fig. 1과 같다.

2% 홍국 첨가식이군은 표준식이군과 4% 홍국 첨가식이군보다 체중증가율이 낮게 나타났으나 4% 홍국 첨가식이군과 표준식이군 사이에는 차이가 없었다. 이로써 홍국 첨가식이 체중증가율에는 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있으며, Yu 등(2)이 보고한 결과와 일치하였다.

식이성 홍국이 간 상해에 미치는 영향

홍국이 간 조직에 미치는 병태생리적 영향을 알아보기 위하여 급성 간 손상시 증가되는 것으로 알려져 있는 체중당 간 무게, 간 조직의 TBARS 함량 및 혈청 중 ALT 활성(29)과 간 손상시 감소된다는 간세포의 G6Pase 활성(23)을 측정 한 결과는 Table 1과 같다.

체중 당 간 무게 및 간 조직의 TBARS 함량의 경우, 홍국 첨가식이군(2% 및 4%)과 표준식이군 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었으나 혈청 ALT 활성의 경우, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비해서 증가되었으나 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다. 간 조직 G6Pase 활성(23)은 2% 및

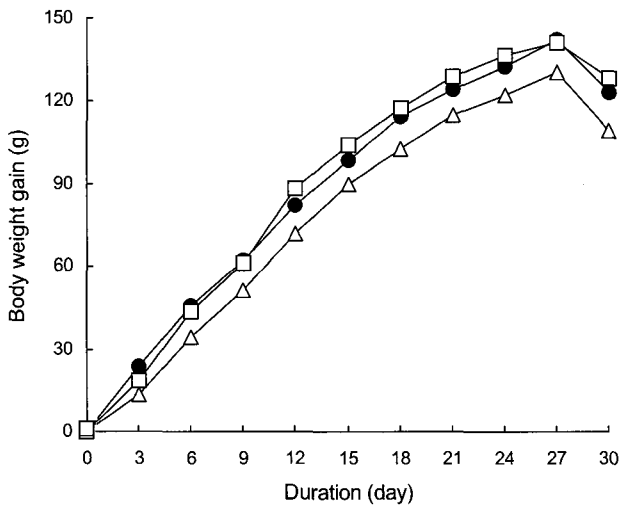


Fig. 1. Eody weight gains of rats. Each value represents the mean of 12 rats. ●-●: Normal, □-□: 2% *Monascus koji*, △-△: 4% *Monascus koji*. No significant difference between each group.

4% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 각각 약 53% ($p < 0.01$) 및 25% 증가되었다.

한편 병리조직학적 소견에서는 2% 및 4% 홍국 첨가식이군과 표준식이군 모두 특이한 병리조직학적 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

이상의 실험결과를 볼 때, 홍국 첨가식이가 간 조직에는 별다른 병태생리적 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 bromobenzene 투여가 간 손상에 미치는 영향

홍국 2% 및 4% 첨가식으로 1개월간 사육시킨 흰쥐에 bromobenzene을 투여하여 간 손상에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 1과 같다. Bromobenzene 투여로 체중당 간 중량에서 표준식이군의 경우 대조군에 비하여 약 33%의 유의한($p < 0.001$) 증가를 보였으며, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군은 각각 28%($p < 0.001$) 및 24%($p < 0.001$) 정도 증가되었다. 따라서 표준식이군과 홍국 첨가식이군 사이에 bromobenzene 투여로 인한 체중 당 간 무게 증가율은 별다른 차이를 나타내지 않았다. 간 조직의 TBARS 함량 변동의 경우, bromobenzene 투여로 인해 표준식이군에서는 대조군에 비해 약 34%의 유의한($p < 0.001$) 증가를 보였으며, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군은 각각 15%($p < 0.05$) 및 18%($p < 0.05$) 정도 유의하게 증가되었다. 또한 혈청 ALT 활성은 대조군에 비해 표준식이군의 bromobenzene 투여군에서 약 26배의 현저한 증가($p < 0.001$)를 보였으며, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군에서는 두 군 모두 각각의 대조군에 비하여 약 13배($p < 0.001$)의 유의한 증가를 보였다. 그러나 bromobenzene 투여로 인해 증가된 혈청 ALT 활성이 2% 및 4% 홍국 첨가식을 섭취함으로써 표준식이군의 bromobenzene 투여군에 비해 각각 35% 및 25% 정도 유의하게($p < 0.05$) 감소하는 현상을 나타내었다. 간 조직 G-6-Pase 활성 변동의 경우, 표준식이군에서는 bromobenzene을 투여함으로써 대조군에 비해 약 20% 감소하였으며, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군은 대조군에 비해 각각 6% 및 22% 정도 감소하였다. 따라서 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene 투여로 인한 간 조직의 TBARS 및 혈청 ALT 활성증가율과 간 조직 G-6-P 감소율이 표준식이군 및

Table 1. Effects of dietary *Monascus koji* on the liver weight/body weight (LW/BW, %), hepatic content of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), and serum alanine aminotransferase (ALT) and hepatic glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) activities in bromobenzene-treated rats

Parameters	Standard		2% <i>Monascus koji</i>		4% <i>Monascus koji</i>	
	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene
LW/BW	2.68 ± 0.06 ¹⁾	3.57 ± 0.11 ^{***a}	2.78 ± 0.08	3.57 ± 0.09 ^{***a}	2.87 ± 0.10	3.55 ± 0.07 ^{***a}
TBARS ²⁾	2.84 ± 0.11	3.81 ± 0.15 ^{***a}	2.97 ± 0.08	3.41 ± 0.12 ^a	3.04 ± 0.07	3.60 ± 0.23 ^a
Serum ALT ³⁾	22.50 ± 4.43	588.00 ± 42.95 ^{***a}	29.17 ± 8.65	380.00 ± 61.37 ^{***a,c}	35.00 ± 6.66	444.00 ± 44.59 ^{***a,c}
Hepatic G-6-Pase ⁴⁾	3.79 ± 0.31	3.03 ± 0.34	5.79 ± 0.49 ^{**b}	5.44 ± 0.52 ^{**c}	5.05 ± 0.48	3.93 ± 0.37

¹⁾Each value represents the mean ± SE of 6 rats. Unit: ²⁾nmole MDA/g of liver tissue, ³⁾Karmen unit/min/mL of serum, and ⁴⁾nmoles pi/min/mg protein. ^aSignificantly different from each control group. ^bSignificantly different from standard control group. ^cSignificantly different from standard bromobenzene group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

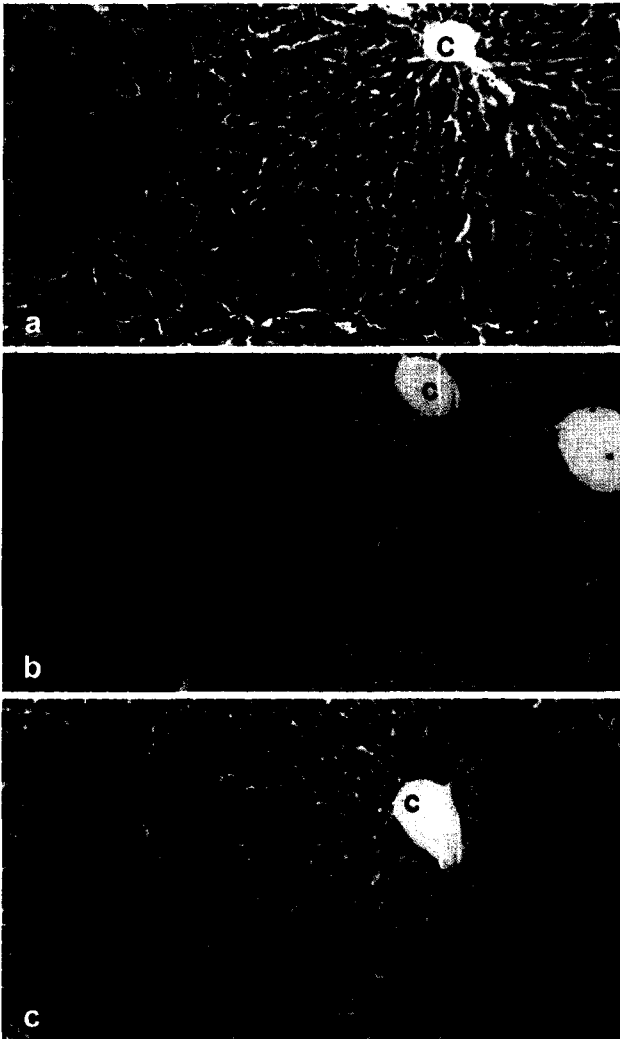


Fig. 2. Microphotographs of liver tissue in control groups, H&E stain, $\times 100$.

a) Standard; the tissue structure, hepatic classic lobules, is intact. b) 2% *Monascus koji*, c) 4% *Monascus koji*; cytoplasmic degeneration (arrow) in hepatocytes contacted with central vein is shown. C: central vein, P: portal triads.

4% 홍국 첨가식이군보다 낮게 나타남을 알 수 있었다.

한편 광학현미경적 병리조직소견에서는 bromobenzene 투여 시, 모든 실험군에서 중심정맥 주변부에 염증세포의 침윤과 간세포 괴사가 관찰되었는데, 각 군간 차이는 크게 나타나지 않았다(Fig. 2). 그러나 표준식이군(Fig. 3a)은 중심정맥 주변부의 염증세포 침윤과 아울러 섬유화가 진행된 모습으로 관찰되었으나, 2% 홍국 첨가식이군(Fig. 3b)은 중심정맥 주변부의 염증세포 침윤만 관찰될 뿐 섬유화 소견은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 2% 홍국 첨가식이군이 염증세포의 침윤과 간세포 괴사소견에도 불구하고 표준식이군에 비해 손상자극이 감소되었음을 말해주는 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라 4% 홍국 첨가식이군(Fig. 3c)과 비교하여 볼 때에도 염증세포의 침윤과 괴사세포의 출현 정도는 2% 홍국 첨가식이군에서 더 경미하게 나타난 것으로 판단

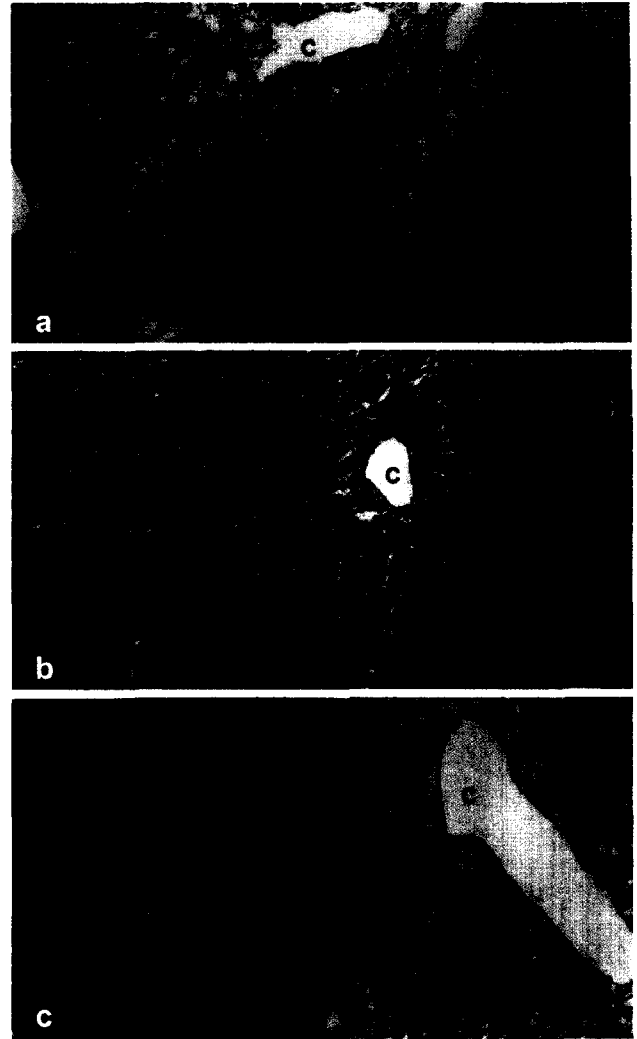


Fig. 3. Microphotographs of liver tissue in bromobenzene-treated groups, H&E stain, $\times 100$.

a) Bromobenzene-treated; infiltration of inflammatory cells (arrow) and vascular-like fibrosis (line arrow) are shown in the central zone of classic lobule. b) Bromobenzene-treated + 2% *Monascus koji*; infiltration of inflammatory cell (arrow) is found in the zone around central vein. c) Bromobenzene-treated + 4% *Monascus koji*; infiltration of inflammatory cells and necrosis of hepatocytes are shown in the central zone of classic lobule. C: central vein, P: portal triads.

되었다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비해서 bromobenzene에 의한 간 손상이 경미하게 나타났으며, 특히 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene에 의한 간 손상이 4% 홍국 첨가식이군보다 경미하게 나타남을 알 수 있었다.

Bromobenzene 유발 간 손상 흰쥐에 bromobenzene 재투여가 간 조직의 CYPdAH, GSH 함량 및 GST 활성에 미치는 홍국의 영향

Bromobenzene에 의한 간 손상이 2% 홍국 첨가식이군에서 경미하게 나타나는 원인을 구명하고자 홍국 식이로 1개

월간 성장시킨 뒤 bromobenzene을 3회 투여한 다음, 24시간 후에 bromobenzene을 재투여하고 4시간째에 처치한 후, bromobenzene의 대사에 관여하는 CYPdAH 활성(12)과 GSH 함량 및 \circ 의 포합 효소인 GST 활성(13)을 간 조직 중에서 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 4).

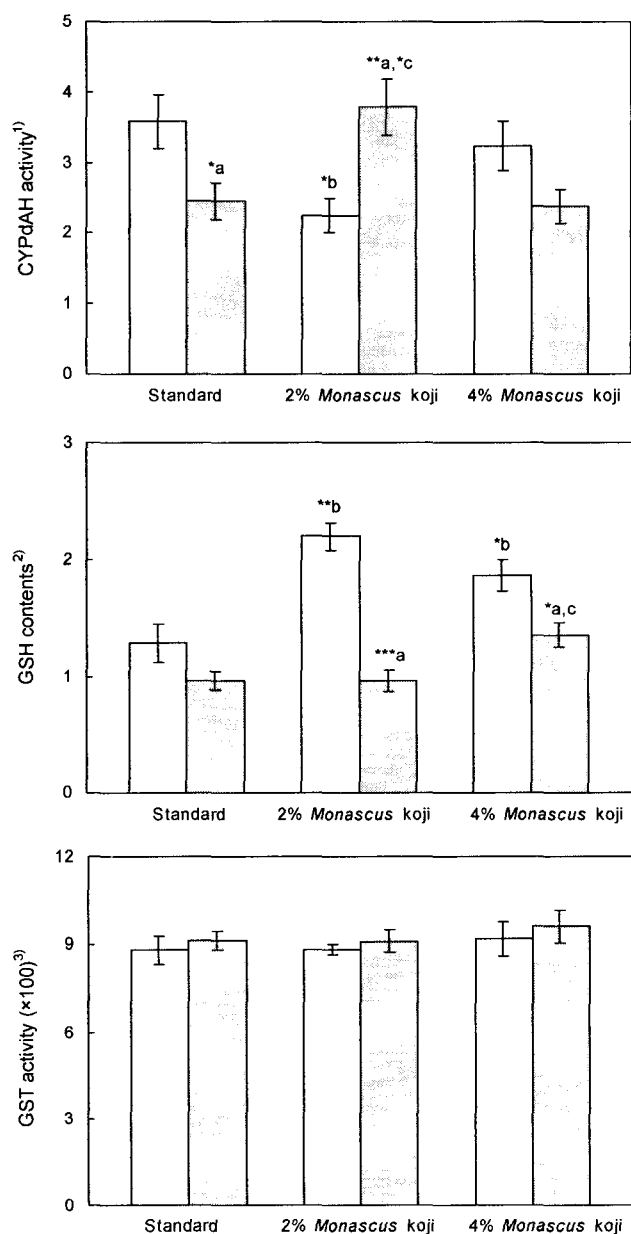


Fig. 4. Effects of dietary *Monascus koji* on the hepatic glutathione (GSH) content, its conjugating enzyme, glutathione S-transferase (GST) and cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) activities in bromobenzene-pretreated rats.

^aSignificantly different from each control group.
^bSignificantly different from standard control group.
^cSignificantly different from standard bromobenzene group.
^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$.
 Unit: ¹⁾p-aminophenol nmoles/hr/mg protein, ²⁾ μ moles of GSH/g of tissue, and ³⁾2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate nmoles/min/mg protein. □: Control, ■: Bromobenzene-pretreated.

Bromobenzene은 생체내에서 cytochrome P450에 의해서 bromobenzene-3,4-oxide로 전환되어 간 조직세포 손상을 유발시키며, GSH와 포합됨으로서 해독되는 것으로 알려져 있다(13). 그리고 Kim 등(11)은 실험동물에게 bromobenzene 투여 시 나타나는 GSH 감소율은 bromobenzene 대사율과 관련이 있는 것으로 보고하였다.

CYPdAH 활성에 있어서 표준식이군에서는 bromobenzene을 재투여함으로써 약 32%($p < 0.05$)의 감소를 보였으나, 2% 홍국 첨가식이군에서는 68%($p < 0.01$) 정도 오히려 증가하였다. 그리고 4% 홍국 첨가식이군에서는 약 26% 감소하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 따라서 2% 홍국 첨가식이군에서는 bromobenzene으로부터 bromobenzene-3,4-oxide 생성율이 다른 실험군보다 높게 나타남을 알 수 있었다.

또한 bromobenzene 재투여 시 간 조직 중 GSH의 함량 감소율을 관찰한 결과, 각각의 대조군에 비해 표준식이군은 26%, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군의 경우는 각각 약 56% ($p < 0.001$) 및 27% ($p < 0.05$)의 유의한 감소를 나타내고 있어 간 조직 GSH 함량의 감소율 역시 2% 홍국 첨가식이군에서 가장 높게 나타남을 알 수 있었다.

한편 GST 활성 변동의 경우는 표준식이군과 홍국 첨가식이군 사이에 별다른 변동을 볼 수 없었다. 이는 간 조직 중 GST단백의 절대량이 매우 크기 때문에 bromobenzene 투여와 같은 병태 생리조건 하에서도 본 효소의 활성 변동이 크게 나타나지 않은 것으로 사료된다.

간 조직 중 GST 활성변동의 반응속도에 미치는 영향

원취에 bromobenzene을 3회 투여한 다음, 24시간 후에 다시 bromobenzene을 재투여한 후 4시간째에 처치하여, 동력학적인 측면에서 간 조직 중 GST의 반응속도에 미치는 영향을 이중역수도(double reciprocal plot)를 이용하여 계산한 결과는 Table 2와 같다.

K_m 치는 각 실험군들 모두 3.33×10^{-4} M로서 유사하게 나타났다. 한편 V_{max} 치는 표준식이군에서 bromobenzene 전처치군은 661 nmol/min/mg protein이었고 4시간 후 bromobenzene 투여군에서는 712 nmol/min/mg protein으로 나타냄으로서 약 8% 증가되었으며, 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene 전처치군은 665 nmol/min/mg protein이었고 4시간 후 bromobenzene 투여군에서는 850 nmol/min/mg protein으로 약 28% 증가되었다. 또한 4% 홍국 첨가식이군의 bromobenzene 전처치군은 694 nmol/min/mg protein이었고 4시간 후 bromobenzene 투여군에서는 868 nmol/min/mg protein으로서 약 25% 증가되고 있어 2% 홍국 첨가식이군에서 V_{max} 치의 변동율이 가장 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene을 전처치한 다음 bromobenzene을 재투여함으로써 V_{max} 치의 변동율이 높게 나타난 것은 2% 홍국 첨가식이군의 단백질 유도 작용이 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군에 비해서 크게 나타

Table 2. Effect of bromobenzene retreatment on the change of K_m and V_{max} value in bromobenzene-pretreated rats fed a *Monascus koji* supplemented diet

Parameters	Standard		2% <i>Monascus koji</i>		4% <i>Monascus koji</i>	
	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene
K_m ¹⁾	3.56×10^{-4}	3.71×10^{-4}	3.70×10^{-4}	3.41×10^{-4}	3.45×10^{-4}	3.35×10^{-4}
V_{max} ²⁾	661	712	665	850	694	868

Each control group indicates the bromobenzene 3 times pretreated group. Each value represents the mean of 3 experiments. Unit: ¹⁾1/glutathione (mM⁻¹) and ²⁾nmole/min/mg protein.

남을 시사해 주고 있다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때, bromobenzene을 3회 투여하여 간 손상을 유도한 후 bromobenzene을 재투여 시, 2% 홍국 첨가식이군에서 간 조직의 CYPdAH 활성 증가율과 GSH 이용율 및 GST 단백질 효소 유도작용이 크게 나타나는 것은 bromobenzene으로부터 bromobenzene-3,4-oxide 생성율과 해독율이 모두 높게 유지된다는 것을 시사해 주고 있다. 그러므로 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene에 의한 간 손상이 경미하게 나타난 것은 bromobenzene의 대사를 증가에 기인되기 때문일 것으로 생각된다.

홍국 첨가식으로 성장한 흰쥐에 bromobenzene 투여가 유해산소 생성 및 해독에 미치는 영향

일반적으로 xenobiotics에 의한 독성작용은 xenobiotics의 대사산물과 더불어 xenobiotics의 대사 중 생성된 유해산소에 기인되어 나타나는 것으로 알려져 있다(30). 유해산소 생성에 관여하는 CYPdAH 활성(3)의 경우 Table 3에 나타난 바와 같이 2% 홍국 첨가식이 대조군은 표준식이 대조군에 비해 약 26% 증가되는 경향을 보였으나, 4% 홍국 첨가식이 대조군과 표준식이 대조군 사이에는 별다른 차이를 나타내지 않았다. 그러나 bromobenzene을 투여함으로써 CYPdAH 활성이 2% 및 4% 홍국 첨가식이군에서 표준식이군에 비해 각각 37%($p < 0.05$) 및 10% 정도 감소하였다. 또한 bromo-

benzene을 투여함으로써 유도된 CYPdAH 활성의 정도를 비교해 볼 때, 대조군에 비해 표준식이군, 2% 및 4% 홍국 첨가식이군에서 각각 약 3.1배($p < 0.001$), 1.5배($p < 0.05$) 및 2.8배($p < 0.001$)의 유의한 증가를 나타내었다. 따라서 bromobenzene 투여로 인한 cytochrome P450에 의한 유해산소 생성율은 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군보다는 감소함을 알 수 있었다. 그리고 유해산소 생성에 관여하는 것으로 알려진 XO 활성의 경우, bromobenzene을 투여함으로써 각각의 대조군에 비해 유의한 XO 활성 감소 현상을 나타내었으나, 섭취한 식이나 bromobenzene의 투여로 인한 각 실험군 사이의 XO 활성 변동은 나타나지 않았다. 이상 실험결과를 보아 각 실험군 간의 유해산소 생성을 차이는 CYPdAH에 기인된 것으로 생각되며, 2% 홍국 첨가식이군에서 유해산소 생성율이 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다.

유해산소에 의한 조직 손상은 유해산소 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 초래되는 것으로 알려져 있다(30). 그러므로 본 실험조건에서 유해산소 해독에 관여하는 효소 활성을 간 조직 중에서 측정하였다.

SOD 활성의 경우, 각 실험군의 대조군 사이에서는 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 약 15%($p < 0.05$)의 유의한 증가를 보였으나, 4% 홍국 첨가식이군은 10% 정도 오히려 감소하였다. 그리고 bromobenzene을 투여함으로써 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 약 31%($p < 0.01$)의

Table 3. Effect of dietary *Monascus koji* on the activities of hepatic oxygen free radical metabolizing enzymes in bromobenzene-treated rats

Parameters	Groups	Standard		2% <i>Monascus koji</i>		4% <i>Monascus koji</i>	
		Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene
Generating systems	CYPdAH ¹⁾	1.16 ± 0.09	3.58 ± 0.38***a	1.46 ± 0.12	2.25 ± 0.24* ^{a,c}	1.14 ± 0.10	3.23 ± 0.35***a
	XO ²⁾	3.17 ± 0.22	1.53 ± 0.16***a	3.33 ± 0.18	1.67 ± 0.20***a	3.58 ± 0.47	1.85 ± 0.16***a
Scavenging systems	SOD ³⁾	78.61 ± 2.95	93.83 ± 5.70* ^a	90.60 ± 2.48* ^b	122.44 ± 7.34* ^{a,c}	70.71 ± 4.54	82.32 ± 2.13* ^a
	GST ⁴⁾	736.78 ± 32.55	881.06 ± 47.04* ^a	812.05 ± 29.32	882.65 ± 19.43	715.98 ± 39.80	919.63 ± 56.85* ^a
	CAT ⁵⁾	24.85 ± 2.49	34.78 ± 5.84	37.53 ± 3.15* ^b	47.16 ± 3.28	35.71 ± 2.70* ^b	36.17 ± 2.52
	GPx ⁶⁾	12.06 ± 1.03	12.40 ± 1.11	17.04 ± 1.52* ^b	14.80 ± 1.35	17.06 ± 1.45* ^b	12.66 ± 1.28* ^a

Each value represents the mean ± SE of 6 rats.

^aSignificantly different from each control group. ^bSignificantly different from control in standard group. ^cSignificantly different from standard group treated with bromobenzene.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Unit: ¹⁾p-aminophenol nmol/hr/mg protein, ²⁾nmol uric acid/min/mg protein, ³⁾50% inhibition of autoxidation of hematoxylin/min/mg protein, ⁴⁾2,4-dinitrobenzene-glutathion conjugate nmol/min/mg protein, ⁵⁾decreased H₂O₂ nmol/min/mg protein, and ⁶⁾NADPH oxidized nmol/min/mg protein.

Abbreviation: CYPdAH, cytochrome P-450 dependent aniline hydroxylase; XO, xanthine oxidase; SOD superoxide dismutase; GTS, glutathione S-transferase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase.

증가를 나타내었고, 4% 홍국 첨가식이군에서는 약 14% 감소되었다. GST 활성의 경우, 각 대조군에서는 2% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 약 10%의 증가 경향을 나타내었으나, 4% 홍국 첨가식이군에서는 별다른 변동을 나타내지 않았고, bromobenzene을 투여함으로써, 2% 홍국 첨가식이군에서는 변화가 없었으나, 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군에서 각각 대조군에 비해 약 20% 및 28%의 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. CAT 활성의 경우, 각 대조군 사이에서는 2% 및 4% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 약 51% 및 44%의 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었고, bromobenzene 투여시에는 표준식이군에 비하여 2% 홍국 첨가식이군에서만 약 36%의 증가를 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다. GPx 활성의 경우, 대조군에서는 2% 및 4% 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 두 군 모두 약 41% ($p < 0.05$)의 유의한 증가를 나타내었고, bromobenzene 투여시에는 2% 홍국 첨가식이군에서만 약 20%의 증가를 나타내었고 4% 홍국 첨가식이군은 큰 차이가 없었다.

이러한 결과로 보아, 홍국 첨가식이군이 표준식이군에 비하여 대체적으로 유해산소 해독계 효소 활성이 높게 나타났으며, 2% 홍국 첨가식이군에서 이러한 효과는 현저하게 나타났다. 따라서 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene 투여로 인한 간 손상에 미치는 유해산소의 영향이 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군에 비하여 적게 나타난 것으로 생각된다.

이상 모든 실험결과들과 문헌상의 지견들을 종합해 볼 때, 식이에 적당량의 홍국을 첨가시킴으로서 bromobenzene에 의한 간 손상이 비교적 경미하게 나타난 것으로 사료되며, 이는 홍국 성분이 bromobenzene 대사율과 대사과정에서 생성된 유해산소의 해독에 영향을 미침으로서 나타난 결과로 생각된다.

요 약

홍국이 bromobenzene에 의한 간 손상에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 흰쥐에 2% 및 4% 홍국 첨가식으로 1개월간 성장시킨 다음 체중 1 kg당 400 mg의 bromobenzene을 1일 1회 복강으로 3회 투여한 다음, 24시간 후에 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 2% 및 4% 홍국 첨가식으로 성장시킨 흰쥐에 있어서 체중증가율은 표준식이군과 별다른 차이를 볼 수 없었으며 간 기능 및 병리조직검사에서도 홍국 섭취로 인한 간 조직의 병태생리적 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 실험동물에 bromobenzene을 투여 시 간 손상 정도가 2% 홍국 첨가식이군에서 가장 경미하게 나타났다. 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene에 의한 간 손상이 경미하게 나타난 원인을 구명하고자 간 손상 실험모델에 bromobenzene을 재투여 시, 간 조직 중 cytochrome P-450 dependant aniline hydroxylase 활성은 대조군에 비하여 2%

홍국 첨가식이군에서는 유의한 증가($p < 0.01$)를 보였으나 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군은 오히려 감소하였다. 그리고 대조군에 대한 간 조직 glutathione 함량 감소율에 있어서는 2% 홍국 첨가식이군에서 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군보다 높게 나타났다. 그러나 간 조직의 glutathione S-transferase 활성은 3군간에 별다른 차이를 볼 수 없었으나 반응속도적 측면에서는 2% 홍국 첨가식이군에서 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군보다 V_{max} 치가 높게 나타났다. 한편 bromobenzene 투여에 의한 간 조직의 cytochrome P-450 dependant aniline hydroxylase 증가율은 2% 홍국 첨가식이군에서 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군보다 낮게 나타났으며, xanthine oxidase 활성은 3군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다. 특히 대조군 및 bromobenzene 투여군 모두 superoxidase dismutase, catalase, glutathione peroxidase 활성은 2% 홍국 첨가식이군에서 표준식이군 및 4% 홍국 첨가식이군보다 높게 나타났다. 이상 실험결과를 종합해 볼 때, 2% 홍국 첨가식이군에서 bromobenzene에 의한 간 손상이 경미하게 나타났으며, 이는 2% 홍국 첨가식이의 섭취로 인한 bromobenzene 대사 및 유해산소 해독의 촉진에 기인되기 때문일 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통미생물 자원개발 및 산업화연구센터(RRC)의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

문 헌

1. Yu TS, Choi HJ, Yoon CG. 2003. Effect of *Monascus* pigment extract on the alcohol metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 603-607.
2. Yu TS, Kim HH, Yoon CG. 2003. Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 244-249.
3. Haws T, Shina T, Isobe A, Kimura S. 1975. Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. *J Jap Soc Food Nutr* 28: 497-502.
4. Hadfield JR, Holker JSE, Stanway DN. 1967. The biosynthesis of fungal metabolites. Part II. *J Chem Soc* 19: 751-754.
5. Fowell ADG, Robertson A, Whelley AB. 1956. Monascorubramine. *J Chem Social Special Pub* 5: 27-34.
6. Hiroi T, Shima T, Isobe A, Kimura S. 1975. Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. *J Japan Soc Food Nutr* 28: 497-502.
7. Ru MR. 1998. 홍국소제에 관한 최근의 동향. *식품산업과 영양* 3: 42-46.
8. Endo A. 1980. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiol* 33: 334-336.
9. Robinson JA. 1991. Polyketide synthase complexes their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Philos*

- Trans R Soc Lond B Biol Sci* 332: 107-114.
10. Martinkova L, Juzlova P, Vesely D. 1995. Biological activity of polyketide pigment produced by the fungus *Monascus*. *J Appl Bacteriol* 79: 609-616.
 11. Kim KJ, Shin JK, Yoon CG. 1997. Effect of circadian rhythms on the bromobenzene metabolism in rats. *Korean J Toxicol* 13: 377-383.
 12. Zheng J, Hanzlik RP. 1991. Premercapturic acid metabolites of bromobenzene derived via its 2,3- and 3,4-oxide metabolites. *Xenobiotica: the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 21: 535-546.
 13. Byland E, Chasseud LF. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 32: 173-219.
 14. Thor H, Moldeus P, Orrenius S. 1979. Metabolic activation and hepatotoxicity. Effect of cysteine, N-acetylcysteine, and methionine on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 192: 405-413.
 15. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serumglutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 58-63.
 16. Karmen A. 1955. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 34: 131-133.
 17. Aebi H. 1974. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York. Vol 2, p 673-684.
 18. Bidlack WR, Lowery GL. 1982. Multiple drug metabolism: *p*-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 3: 311-317.
 19. Paglia ED, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
 20. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid and formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
 21. Martin JPJ, Dailey M, Sugarman E. 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 255: 329-336.
 22. Yoon CG. 1984. A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal (Keimyung Junior College)* 2: 295-308.
 23. Hasumura Y, Tescke R, Lieber CS. 1974. Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity and its metabolism after chronic ethanol consumption. *Castroenterol* 66: 415-422.
 24. Fiske CH, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem* 66: 375-400.
 25. Ohkawa H, Ohish N, Yaki K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-355.
 26. Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
 27. Lowry OH, Rosenbrough WJ, Farr AH, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 28. Scheffler WC. 1980. *Statistics for the biological sciences*. Addison-Wesley, London.
 29. Yoon CG, Jeon TW, Lee HJ. 1999. Effect of xylene administration on the levels of serum xanthine oxidase activity in liver damage induced rats with CCl₄. *J Inst Nat sci (keimyung university)* 18: 103-108.
 30. Yoon CG, Lee MK, Lee SI. 1998. Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl₄ treated rats. *Korean J Gerontol* 8: 35-42.

(2004년 3월 11일 접수; 2004년 7월 2일 채택)