

In vitro 및 *in vivo*에서 된장의 암예방 효과

-2. 된장 추출물이 Sarcoma-180 이식 마우스의 혈청 및 간내 주요 효소활성에 미치는 효과-

부산대학교 식품영양학과 및 암연구소, ¹경남정보대학 식품영양학과
²경성대학교 약학대학

손미현 · 문숙희¹ · 최종원² · 박건영

Cancer Preventive Effects of *Doenjang* *in vitro* and *in vivo*

-2. Effects of *Doenjang* Extracts on the Changes of Serum and Liver Enzyme Activities in Sarcoma-180 Transplanted Mice-

Mi-Hyun Son, Suk-Hee Moon¹, Jong-Won Choi² and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, and Pusan Cancer Research Center,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Kyungnam College of Information &
Technology, Pusan 616-701, Korea

²College of Pharmacy, Kyungsoo University, Pusan 608-736, Korea

The effects of *doenjang* extracts on the changes of some serum and liver enzyme activities in sarcoma-180 transplanted mice were studied. The activities of serum aminotransferases (AST, ALT) were increased by the sarcoma-180 cell treatment compared with control, while the activities of these enzymes decreased significantly by the treatment of *doenjang* extracts. Lipid peroxide content in the liver that increased by the injection of sarcoma-180 cells to the mice decreased considerably and the hepatic xanthine oxidase activity was also inhibited after the treatment of *doenjang* extracts. The activities of microsomal oxidizing enzymes (aminopyrine N-demethylase and aniline hydrolase) were not affected significantly by the treatment of *doenjang* extracts to the sarcoma-180 cell injected mice. Hepatic glutathione S-transferase activity and glutathione content decreased by the sarcoma-180 cell treatment, but the activity and the content were increased by the treatment of *doenjang* extracts in the mice, respectively. The activity of glutathione reductase was increased by the treatment of *doenjang* extracts, especially by the methanol extract of *doenjang*. But, γ -glutamylcystein synthetase activity was not affected. These results suggest that *doenjang* extracts have a possible protective effect on the sarcoma 180 cell-induced hepatotoxicity in mice.

Key Words: *Doenjang* extracts, Serum and liver enzymes, Sarcoma-180 cells, Mouse

서 론

된장은 단백질원인 콩이 주원료로 된장의 구성성분은 아미노산과 펩티드, 당류와 덱스트린, 발효산물인 유기산과 알코올 그리고 소금을 주성분으로 하고 있기 때문에 구수한 맛, 단맛, 고유한 향미와 짠맛이 조화된 천연의 조미료이며 한국의 중요 발효식품이다. <동의보감>에 '장은 모든 어육, 채소, 버섯의 독을 지우고 또 열상과 화독을 다스린다'고 하였고, <일화본초>에는 '된장은 모든 해어, 육류, 채소, 버섯의 독을 푸는데 효과가 있다'고 하여,¹⁾ 된장은 맛을 내는 조미료의 역할뿐 아니라 질병을 치료하는 만병통치약으로 여겨졌던 것 같다. 실제로 가벼운 상처나 화상에 된장을 발라서 화상을 방지하고 상처를 치료했다는 것은 널리 알려진 민간요법 중의 하나이다.

박등²⁾은 재래식 된장에 aflatoxin B₁에 의해 유도되는 돌연변이성을 억제하는 효과가 있음을 밝혔으며, 재래식 된장은 생콩이나 삶은 콩보다 훨씬 항돌연변이 활성이 크고, 일본된장(miso)을 비롯한 다른 콩발효제품보다 항돌연변이 활성이 높았다고 했다. 된장의 암 예방효과는 된장을 끓인 후에도 있었으며,³⁾ 여러 종류의 발암원에 대해 항돌연변이 활성이 확인되었다.⁴⁾ 된장추출물들은 C3H/10T1/2 세포에서 MCA에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있었으며 transformation test에서는 생체에서 발암의 지표인 Type II, III foci 형성비율을 현저히 감소시켜 된장의 추출물은 진핵세포계에서도 발암과정을 강하게 억제하는 것으로 나타났다.⁵⁾ 이 외에도 된장추출물은 AGS 인체위암세포, HT-29 인체 결장암세포의 성장을 저해하고, 암세포의 DNA 합성을 억제하며, 이들 암세포의 형태학적 변화를 유발시킨다고 하였다.^{6,7)} 된장의 핵산추출물은 MCF-7 인체 유방암세포에서 세포주기의 단백질인 cyclin B₁의 생성과 이의 mRNA 합성을 억제하여 G₂에서 M phase로 가는 단계를 차단하여 항암효과를 나타낸다.⁵⁾ 재래식 된장은 콩발효식품으로 콩이 가지는 여러 항암물질 즉, 불포화지방산,^{8~11)} 트립신 인히비터,^{12~15)} 이소후라본,¹⁶⁾ 비타민 E,¹⁷⁾ 식이섬유소¹⁸⁾ 등에 의해 항(발)암 활성이 있을 수 있으며, 콩을 발효·숙성시킨 된장이 보다 높은 활성을 나타내는 이유는 생콩에서와는 달리 다른 어떤 발효산물이 항돌연변이 및 항암효과와 관련이 있으리라 생각되고 있다.

한편 항암물질에 의한 효소계의 변화를 알아보기 위해서는 정상 마우스에 시료를 투여한 것과 sarcoma-180 암세포를 이식한 마우스에 시료를 투여하고 적출한 간과 혈청을 이용하여 혈청내 aminotransferase 활성을 측정하는 방법이 있고, 간독성의 검사와 간해독 효소계 즉 lipid peroxidase, xanthine oxidase, microsomal oxidizing system, glutathione S-transferase 변화 및 과산화지질, glutathione 함량 변화를 측정하는 방법이 있다.^{19~26)} Lipid peroxidase, microsomal oxidizing system, glutathione S-transferase 등은 free radical 같은 내인성 요인에 의해 생성된 친전자성 물질의 독성작용을 해독시켜준다고 한다.^{5,20,27,28)} Mirsalis 등²⁹⁾은 콩추출물이 화학 발암물질을 무독화시키는데 필요한 효소들 즉 glutathione S-transferase와 UDP-glucuronyl transferase의 활성을 증가시킨다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 된장을 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물 등으로 나누어 정상 마우스 및 sarcoma-180 세포를 이식한 마우스에 투여한 후 적출한 마우스의 간을 이용하여 이들 된장추출물들이 마우스의 간의 효소계에 미치는 영향과 혈액을 이용한 간독성 예방 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 된장시료 및 추출물의 제조

실험에 이용된 조선된장의 특징과 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물의 조제법은 전보³⁰⁾와 같다.

2) 동물실험

실험동물은 한국 생명과학연구소(대구)로부터 구입한 Balb/c mouse로 1주일간 일반 고형사료(삼양사, 서울)로 예비 사육한 후 체중이 30 g 전후의 것을 전보의 고형암 성장저지 실험방법³⁰⁾과 동일하게 하여 고형암을 적출하고 간조직 및 혈청을 분리하여 본 실험에 사용하였다.

3) 효소원의 조제

CO₂ gas로 마취시켜 복부 정중선을 따라 개복한 다음, 심장으로부터 채혈하였으며, 채혈 직후 4°C 이하의 생리 식염수로 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈

액을 제거한 후 간장을 적출하였다. 간조직 1 g당 2 mM-mercaptoethanol이 함유된 4배량의 0.25M sucrose buffer (pH 7.5)를 가하여 병냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 세포부분을 제거하고 다시 1,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol 분획으로, 그 침전물에 동일한 양의 0.25M sucrose buffer를 가하여 현탁시킨 액을 microsome 분획으로 하였다. Microsome 분획은 현탁한 후 재원심분리하여 효소원으로 사용하였다. 이렇게 얻은 homogenate는 glutathione 함량과 lipid peroxide 함량측정, microsome 분획은 aniline hydroxylase와 aminopyrine N-demethylase 활성측정에, cytosol 분획은 xanthine oxidase, γ -glutamylcystein synthetase, glutathione reductase 및 glutathione S-transferase 활성 측정에 사용하였다. 한편, 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리하고 상등액인 혈청을 얻어 이것을 혈액중 transaminase의 효소원으로 사용하였다.

4) 혈청 aminotransferase (ALT, AST) 활성 측정

혈청 aminotransferase의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법³¹⁾에 준하여 조제된 kit (아산제약)를 사용하여 alanine transaminase (100 ml당 DL-alanine 1,780 mg 및 α -ketoglutaric acid 29.2 mg 함유), aspartate transaminase (100 ml당 L-aspartic acid 2,660 mg 및 α -ketoglutaric acid 29.2 mg 함유) 및 기질액 1.0 ml를 가하여 37°C에서 5분간 preincubation시킨 다음 혈청 0.2 ml를 넣어 37°C에서 alanine transaminase는 30분, aspartate transaminase는 60분 반응시킨 후 정색시약 (2,4-dinitrophenylhydrazine, 19.8 mg/100 ml 함유) 1.0 ml를 첨가한 다음 0.4N-NaOH 용액 1.0 ml를 가하여 혼합한 후 10분간 실온에서 방치하고 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하여 그 활성도를 표준검량선에 준하여 혈청 1 ml당 Karmen unit³²⁾로 표시하였다.

5) Lipid peroxide의 측정

Ohkawa등³³⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 10% 간균질액 0.4 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2

ml, 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5 ml와 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid 1.5 ml를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 실온에서 *n*-butanol : pyridine (15 : 1) 5.0 ml와 H₂O 1 ml를 첨가하여 잘 섞은 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여서 홍색의 *n*-butanol : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정한다 다음 표준곡선에 준하여 그 함량을 조직 1 g당 malondialdehyde의 양을 nmole로 표시하였다.

6) Xanthine oxidase의 측정

Stripe등¹⁹⁾의 방법에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 기질인 xanthine sodium과 효소원 및 전자수용체인 NAD를 가하여 37°C에서 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid를 가하여 제단백시키고 상등액을 취한 후 생성된 uric acid의 흡광도를 파장 292 nm에서 측정하여 xanthine dehydrogenase와 xanthine oxidase 활성도의 합으로 산정하고, NAD를 뺀 반응액 중에서 생성된 uric acid의 양을 파장 292 nm에서 읽은 값을 xanthine oxidase의 활성도로 계산하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다.

7) Microsomal oxidizing system 효소계

(1) Aminopyrine N-demethylase의 활성 측정

Nash등²⁴⁾의 방법을 약간 변형하여 반응액 2 ml중에 0.1M Na⁺/K⁺ buffer (pH 7.5)에 2 mM aminopyrine HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액(300 ~ 400 μ g의 단백질)를 가해 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 15% ZnSO₄ 2 ml와 포화 Ba (OH)₂ 2 ml를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치 후 20분간 원심분리하여 여기서 얻은 상등액 5 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent 2 ml를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상등액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분간에 mg protein이 생성한 formaldehyde의 양을 nmole로 표시하였다.

(2) Aniline hydroxylase 활성의 측정

Bidlack과 Lowery²⁵⁾의 방법에 준하여 반응액 2 ml중에 10 mM MgCl₂와 150 mM KCl이 함유된 50 mM

Tris HCl 완충액(pH 7.4)에 1 mM alanine HCl, 0.5 mM NADPH 및 효소액(300 ~ 400 μ g 단백질)를 가하여 이 액을 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 반응을 종결할 목적으로 20% trichloroacetic acid 2 ml를 가한 후 10분간 원심분리하여 상등액 2 ml를 취하고 발색의 목적으로 10% Na₂CO₃와 0.2N-NaOH (2% phenol 함유) 2 ml를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1시간에 mg protein이 생성한 *p*-aminophenol의 양을 nmol로 표시하였다.

8) Glutathione S-transferase의 활성 측정

Habig등²⁰⁾의 방법에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.5)중에 0.04M reduced glutathione 0.075 ml를 가한 후 효소액을 0.1 ml 넣고 blank에는 20% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가해 600 \times g에서 원심분리하여 단백질을 제거하고 시료는 25°C에서 5분간 반응시킨 후 blank와 시료 각각에 기질로써 0.12M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 0.025 ml 가하여 25°C에서 2분간 반응시킨 다음 시료에 20% trichloroacetic acid를 가해 반응을 완결시킨 후 blank와 시료 각각을 원심분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정한 다음 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole 흡광계수 9.6 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 양을 nmole로 표시하였다.

9) 조직중의 glutathione의 함량 측정

Ellman의 방법²¹⁾에 준하여 효소원(400 ~ 600 μ g 단백질)에 제단백 시약으로 4% sulfosalicylic acid를 가하여 단백질을 제거한 상등액에 disulfide reagent (0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 녹임) 2.7 ml를 가하여 생성되는 청색을 412 nm에서 측정하고 표준 곡선에 의하여 산정하였으며, 단위는 조직 1 g당 glutathione μ mole로 표시하였다.

10) Glutathione 생성효소계

(1) Glutathione reductase의 활성 측정

Mize등²³⁾의 방법에 따라 반응액 3 ml중에 0.1M

potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.94 mM EDTA, 4.6 mM oxidized glutathione, 0.16 mM NADPH 및 효소원(400 ~ 600 μ g의 단백질)을 가한 후 37°C에서 10분간 반응시켜 340 nm에서 NADPH의 감소율을 측정하여 표준검량선에 준하여 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg protein이 생성하는 glutathione의 양을 nmole로 표시하였다.

(2) γ -Glutamylcystein synthetase의 활성 측정

Meister등²²⁾의 방법에 준하여 반응액 1 ml중에 0.1M Tris HCl buffer (pH 8.0)에 8.9 mM L-glutamic acid, 0.94 mM EDTA, 3.2 mM MgCl₂, 1.35 mM ATP 및 1 mM L- α -aminobutyric acid에 효소원(100 ~ 200 μ g의 단백질)을 가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 10% TCA로 반응을 완료시키고 상등액에 유리되는 P_i를 molybdic acid와 aminonaphthol sulfonic acid를 가하여 생성되는 황색을 600 nm에서 흡광도를 읽고 표준 검량선에 의하여 산정하였다. 효소 활성도는 1분당 1 mg protein이 생성되는 P_i의 양을 nmole로 표시하였다.

11) Protein 정량

단백질의 함량은 Lowry등²⁶⁾의 방법에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다.

12) 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 data로 ANOVA를 구한 후 Duncan's new multiple range test 또는 Student's *t* test를 이용하여 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

1) Aminotransferase (AST 및 ALT)의 활성 변화

Aminotransferase는 간 세포막에 존재하는 것으로 독성물질에 의해 간세포가 손상을 받을 경우 혈중으로 유리되어 혈중농도가 상대적으로 증가되므로 간독성의 지표로 널리 이용되고 있다.³⁴⁾ Aminotransferase는 asparatate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)로서 amino acid와 α -keto acid와의 사이에 amino기 전이반응을 촉매하는 것으로 알려져 있으며, AST, ALT는 세포내 위치에 따라 다

른 isoenzyme으로 존재하고, 모든 장기에 존재하지만 AST는 심장, 간, 골격근에 많고, ALT는 간에 많아 그 특이성이 인정된다.³⁴⁻³⁶⁾ 간장 장애의 지표가 되는 AST 및 ALT의 활성의 증가는 알코올, 유기용매 및 기타 독소에 의한 간 실질세포에 장애가 발생하여 혈중으로 방출이 증가되어 나타난다.³⁷⁾

AST의 활성은 정상 마우스의 대조군의 경우 71.0으로 나타났으나 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물로 처리한 것은 각각 64.5, 62.4 및 66.2로 대조군보다 대체로 낮게 나타났으며 특히 메탄올추출물 처리가 가장 낮았다($p < 0.05$, Table 1). Sarcoma-180 세포를 처리한 마우스에서 AST의 활성은 대조군이 88.3로 나타나 sarcoma-180이 간에 독성을 유발하는 것으로 보이며, 이는 급성 간 손상이 그 활성도가 혈청중에서 증가한다는 윤³⁸⁾의 보고와도 일치한다. 된장의 메탄올추출물은 72.4로 대조군에 비해 유의적인 감소($p < 0.05$)를 보였으나 된장의 핵산추출물 및 열탕추출물로 처리한 것은 88.3 및 84.9로 대조군과 비슷하여 저해효과가 없는 것으로 나타났다(Table 1). ALT의 활성은 정상 마우스의 대조군이 33.3인데 비해 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 30.2, 29.8 및 29.8로 ALT의 활성이 감소하였다($p < 0.05$). Sarcoma-180 세포를 마우스에 이식한 후 ALT의 활성의 변화를 보면 대조군이 41.6로 AST에서와 같이 정상 마우스의 대조군에 비해 효소 활성이 증가되어 sarcoma-180 세포 투여가 간에 독성을 일으킴을 확인할 수 있었다. 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물로 처리한 것은 각각 31.7, 25.2 및 27.9로 나타나 sarcoma-180 세포를 이식하기 전과 유사한 경향으로 ALT의 활성이 감소되었으며 특히 된장의 메탄올추출물 처리시 ALT의 활성이 유의적으로 크게 저하되어 sarcoma-180 세포 이식으로 인한 간세포의 손상을 회복해 주는데 효과가 있다고 사료되며, 그 효과는 AST의 활성에서와 마찬가지로 된장의 메탄올추출물 처리시 가장 효과가 컸다($p < 0.05$).

2) Lipid peroxide의 활성 변화

지질과산화물은 지질 성분인 불포화 지방산에 산소가 첨가되어 과산화된 지질로 특히 생체내에서의 과산화 현상은 세포막의 주요 구성성분인 인지질을 구성하는 불포화 지방산이 활성산소와 결합하여 생기게 되는데 이와 같은 현상은 불포화 지방산이 많고 인지질 함

Table 1. Effect of various doenjang extracts on serum aminotransferase (AST, ALT) activities in sarcoma-180 treated mice

| Treatment | AST | ALT |
|---------------------|-------------------------|------------------------|
| | Karmen unit/ml of serum | |
| Control | 71.0±4.9 ^{bc} | 33.3±1.3 ^b |
| Hexane ext. | 64.5±5.3 ^{cd} | 30.2±1.6 ^c |
| Methanol ext. | 62.4±2.6 ^d | 29.8±1.7 ^{cd} |
| Boiling ext. | 66.2±4.2 ^{bcd} | 29.8±1.8 ^{cd} |
| S-180+Control | 88.3±5.5 ^a | 41.6±0.4 ^a |
| S-180+Hexane ext. | 88.3±1.6 ^a | 31.7±0.2 ^{bc} |
| S-180+Methanol ext. | 72.4±1.3 ^b | 25.2±0.5 ^e |
| S-180+Boiling ext. | 84.9±3.1 ^a | 27.9±0.9 ^d |

AST: aspartate aminotransferase

ALT: alanine aminotransferase

7 day-old sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain. 5 mg/kg of the doenjang extracts or the equal volume of phosphate buffered saline (control) was I.P. injected once a day for 20 days from 24 hr following the transplantation. Means with the different letters are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test ($n=10$)^{a,b}. All mice were sacrificed at 5 weeks following the transplantation.

량이 풍부한 mitochondria, microsome, erythrocyte, platelet 등의 세포막에서 쉽게 일어날 수 있다.³⁹⁾ 과산화지질의 생성은 활성형 산소인 superoxide radicals의 생합성을 출발점으로 하여 전개되는 일련의 연쇄반응에 의존하고 있다. 지질성분의 과산화작용 결과 세포를 구성하는 세포막 성분은 알코올, 케톤, 알데히드, 메탄, 에탄 등 여러종의 분해생성물로 분해되므로 결국 생체내의 정상적인 작용을 상실하게 되며 뿐만 아니라 이들 분해생성물의 독성연구 결과 각종 효소작용 억제, 세포괴사, 미세혈관 병변 등이 유발된다.⁴⁰⁾ 간에서 초기 과산화지질의 지표인 MDA를 측정함으로써 된장추출물에 의한 lipid peroxide의 함량의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 정상 마우스의 대조군은 17.7이었고 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물로 처리한 것은 18.4, 18.0 및 18.3으로 대조군과 활성이 비슷하였다. 한편 sarcoma-180 세포를 처리한 마우스의 경우 lipid peroxide의 함량은 대조군이 25.2인데 비해 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물로 처리한 것은 각각 20.7,

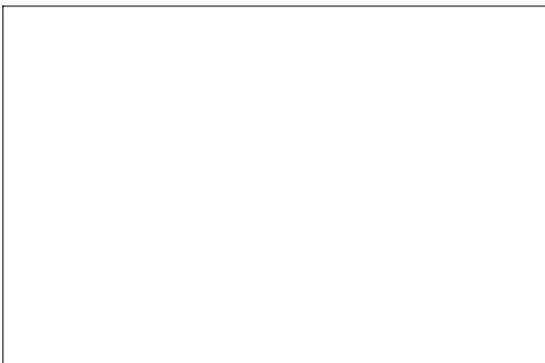


Fig. 1. Effect of doenjang extracts on hepatic lipid peroxide content determined as malondialdehyde in Balb/c mice.

Normal is 5 mg/kg of the doenjang extracts or the equal volume of phosphate buffered saline (control) was I.P. injected once a day for 20 days. 7 day-old sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain. The samples were injected with the same manner as in the normal after 24 hr transplantation^{a-c}. Means with the different letters surmounted on the bars are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=10). All mice were sacrificed at 5 weeks following the transplantation.

19.2 및 17.2로 대조군보다 낮게($p < 0.05$) 나타났으며, 특히 열탕추출물 처리시 lipid peroxide의 함량이 가장 많이 감소되었다(Fig. 1). 따라서 sarcoma-180 암세포 투여로 증가된 lipid peroxide의 함량이 된장추출물의 처리로 유의하게 억제되어 급성 간 손상을 받더라도 과산화지질을 적게 형성한다고 사료된다.

3) Xanthine oxidase의 활성 변화

체내에 지질 과산화물을 유발하여 독성을 일으키는 과정에서 일반적으로 free radical이 관여한다고 알려져 있고, free radical의 generating 효소계는 non-microsomal oxidizing system인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 등이 알려져 있다.^{41,42} 정상적인 경우에는 생체내에서 xanthine oxidase는 주로 xanthine dehydrogenase로 존재하고 있으나 병적 상태가 진행되거나 과잉의 단백질 분해효소에 의한 가수분해를 받을 경우에는 oxidase형으로 형전환이 일어난다.^{41,42} 이렇게 형전환된 xanthine oxidase가 superoxide anion 생성에 관여하며 소장, 신장 및 심장 등의 허혈-혈관류에 의한 조직 손상실험에서 조직병변의 직접적

인 원인은 활성 산소나 이들에 의해서 생성되어지는 free radical로 이 산소의 생체내 역할은 많은 관심을 갖게 하고 있다.^{43,44} 즉 산소 결여 상태의 조직에 산소를 재공급 할 때 형전환된 xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 hydroxy radical과 같은 oxygen-derived free radical이 cellular deterioration의 일차적인 원인임을 제시하고 있다.⁴⁵⁻⁴⁷

Xanthine oxidase 활성의 변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 정상 마우스의 경우 대조군이 0.82인데 비해 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 0.94, 0.92 및 0.94로 다소 증가하였다. Sarcoma-180 세포를 이식한 마우스의 경우 xanthine oxidase 활성은 대조군이 1.24로 정상 마우스에 비해 매우 높게 나타났으나 여기에 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물로 처리한 것은 각각 1.09, 0.81 및 0.98로 정상 마우스의 대조군과 비슷한 수준으로 xanthine oxidase 활성이 감소하였으며, 특히 된장의 메탄올추출물 처리시 활성이 크게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 2). 결국 된장추출물은 xanthine oxidase 활성의 항상성을 유지하는 역할을 하였으며 암세포 이식으로 증가된 xanthine oxidase의 활성을 정상으로 낮추는 효과를 나타내었다.

4) Microsomal oxidizing system 효소계에 미치는 영향

Microsomal oxidizing enzyme system인 cytochrome P-450은 mixed function oxidase로 결합형태와 조직에 따라서 aminopyrine을 기질로 하여 formaldehyde를 생성하는 type I계와 aniline을 기질로 하여 *p*-aminophenol을 생성하는 type II계로 분류되며 이는 microsomal계의 free radical 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{48,49} 된장추출물에 의한 이들 효소의 활성 변화는 Table 2에서 보듯이 aminopyrine N-demethylase의 활성은 정상 마우스의 경우 대조군이 3.15를 나타내었고 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 3.79, 3.65 및 3.41을 나타내어 증가하는 추세를 보였다. 또한 sarcoma-180 세포를 이식한 마우스에서 이 효소의 활성은 대조군은 3.66을 나타낸 데 비해 된장의 핵산추출물을 처리한 것은 3.80으로 다소 증가하였으나 된장의 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 3.60

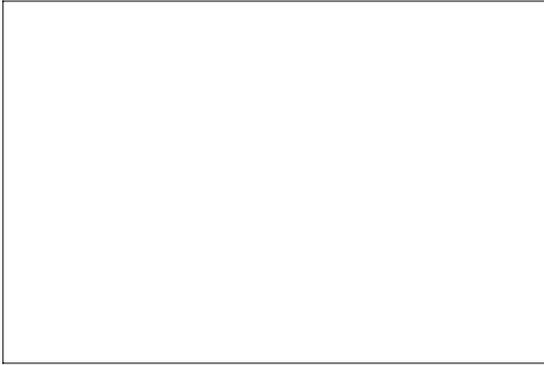


Fig. 2. Effect of doenjang extracts on hepatic cytosolic xanthine oxidase activity in Balb/c mice.¹⁾

¹⁾The explanation of the methods of experimental procedure and statistical analysis is the same as the footnote of Fig. 1.

및 3.26으로 다소 감소하는 것으로 나타났다.

또한 aniline hydroxylase의 활성은 sarcoma-180 세포를 이식한 마우스에서 대조군이 0.42를 나타내어 정상 마우스에서보다 활성이 감소하였으며, 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 0.47, 0.47 및 0.48을 나타내어 다소 증가하는 경향을 보였다(Table 2). 따라서 sarcoma-180 세포의 투여로 인한 free radical의 형성은 microsomal enzyme system보다는 non-microsomal enzyme system을 통한 대사에서 활성산소의 생성이 증가되어 간 손상을 초래하는 것으로 생각된다.

5) Glutathione S-transferase의 활성 변화

내인성 요인에 의해 생성된 친전자성 물질을 포함하는 free radical들은 체내에서 여러 가지 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 해독기구의 작용으로 무독화된다.^{20,50)} 항발암 효소로 알려진 glutathione S-transferase는 생체 대부분의 조직에 함유되어 있으며 특히 간에 많이 함유되어 있는데,⁵¹⁾ glutathione S-transferase의 체내 중요한 역할중의 하나는 친전자성 발암물질의 활성 대사산물의 해독작용으로써⁵²⁾ 발암물질은 생체내에서 cytochrome P-450이나 phosphotransferase 등의 각종 약물 대사효소에 의해 활성화되어 DNA 손상을 일으키지만 glutathione S-transferase는 이들 소수성 잔기를 가지는 활성 대사물을 기질로 하고 여기에 glutathione을 공급 결합시켜 안정화된 형태를 만들며 최종적으로 노중으로 배설시킴으로써 해독작용을 한다고 알려져 있다.⁵³⁾ 된장추출물에 의한 glutathione S-transferase의 활성의 변화를 관찰한 결과 정상 마우스에서는 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 각각 0.53, 0.54 및 0.55를 나타내어 대조군에 비해 glutathione S-transferase의 활성이 대체로 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다(Fig. 3). 한편 sarcoma-180 암세포를 처리한 경우 대조군의 효소활성은 0.41을 나타내어 정상 마우스에 비해 크게 감소되었으나 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물 처리시 glutathione S-transferase의 효소 활성이

Table 2. Effect of various doenjang extracts on hepatic microsomal aminopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase activities in sarcoma-180 treated or not treated Balb/c mice¹⁾

| Treatment | Activity | |
|---------------------|--|---|
| | Formaldehyde formed nmole/mg protein/min | p-aminophenol formed nmole/mg protein/min |
| Control | 3.15±0.35 ^c | 0.48±0.05 ^a |
| Hexane ext. | 3.79±0.11 ^a | 0.46±0.09 ^a |
| Methanol ext. | 3.65±0.09 ^{ab} | 0.45±0.07 ^a |
| Boiling ext. | 3.41±0.05 ^{bc} | 0.45±0.08 ^a |
| S-180+Control | 3.66±0.05 ^{ab} | 0.42±0.04 ^a |
| S-180+Hexane ext. | 3.80±0.08 ^a | 0.47±0.07 ^a |
| S-180+Methanol ext. | 3.60±0.06 ^{ab} | 0.47±0.08 ^a |
| S-180+Boiling ext. | 3.26±0.09 ^c | 0.48±0.03 ^a |

¹⁾The explanation of the methods of experimental procedure and statistical analysis is the same as the footnote of Table 1.

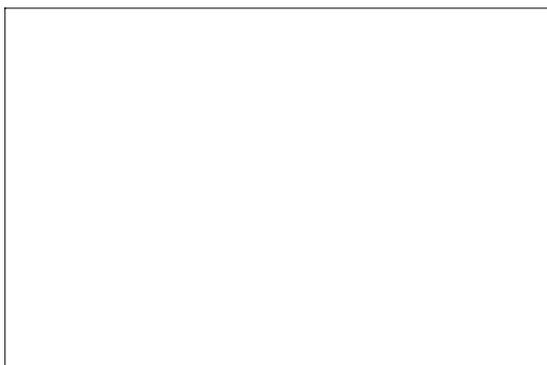


Fig. 3. Effect of doenjang extracts on the activities of hepatic cytosolic glutathione S-transferase in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.¹⁾

¹⁾The explanation of the methods of experimental procedure and statistical analysis is the same as the footnote of Fig. 1.

대체적으로 증가되었으며 특히 된장의 메탄올추출물 처리시 이 효소의 활성이 가장 크게 증가되었다($p < 0.05$, Fig. 3). 따라서 정상적인 상태에서는 자연적인 해독에 관여하는 glutathione S-transferase의 활성을 낮추고 암으로 인한 비정상적인 상태에서는 된장추출물에 의해 glutathione S-transferase의 활성이 증가되어 독성물질을 대사시켜 체외로 배출시키는 것으로 생각된다.

6) Glutathione 함량의 변화

천전자성 물질들과 활성산소 및 과산화지질의 최종 무독화 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되어지며 이 물질의 세포내 합성 유지에는 합성계 효소와 해독 반응 후 생성되는 산화형 glutathione의 재환원 효소가 관여하고 있다.^{27,28)} 된장추출물 투여로 인한 glutathione 함량의 변화를 보면 정상적인 마우스에서 대조군은 0.51로 나타났으며 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 0.43, 0.46 및 0.45로 대조군에 비해 다소 감소되었으나 통계적인 유의성은 없었다. Sarcoma-180 세포를 이식한 경우 대조군은 0.31로 나타나 sarcoma-180 암세포를 이식하지 않은 정상 마우스의 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. 한편 된장의 핵산추출물을 처리한 것은 glutathione 함량이 0.33을 나타내 대조군과 비슷하였으나 된장의 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것



Fig. 4. Effect of doenjang extracts on hepatic cytosolic glutathione content in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.¹⁾

¹⁾The explanation of the methods of experimental procedure and statistical analysis is the same as the footnote of Fig. 1.

은 0.53 및 0.49로 대조군(0.31)에 비해 glutathione 함량이 유의적인 증가를 보였으며($p < 0.05$) sarcoma-180 암세포를 이식하지 않은 이들 시료액 처리군과 비슷한 함량을 나타내었다(Fig. 4). Glutathione 함량의 이런 변화로 보아 된장의 시료들은 정상적인 상태에서는 glutathione의 역할을 대신하고, 암과 같은 비정상적인 상태에서는 glutathione 함량을 증가시켜 독성물질을 대사시켜 체외로 배출시키는 것으로 생각되어진다.

7) Glutathione 생성계에 미치는 영향

Sarcoma-180 세포의 이식과 된장추출물의 투여로 glutathione의 함량 증감 현상을 관찰하고서 이러한 glutathione의 증감 현상을 규명할 목적으로 산화형 glutathione의 재환원 효소인 glutathione reductase의 활성과 glutathione의 합성계에서 rate-limiting 효소인 γ -glutamylcystein synthetase의 활성을 관찰한 결과, glutathione reductase의 활성의 변화는 정상 마우스의 경우 대조군이 60.2를 나타낸 것에 비해 된장의 핵산추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 50.2, 된장의 메탄올추출물을 처리한 것은 54.1로 대조군보다 glutathione reductase의 활성이 낮아졌다(Fig. 5). Sarcoma-180 세포를 이식한 마우스의 대조군은 43.2로 sarcoma-180 세포를 이식하지 않은 마우스에 비해 glutathione reductase 활성이 상당히 감소하였다(p



Fig. 5. Effect of doenjang extracts on the activity of hepatic cytosolic glutathione reductase in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.¹⁾

¹⁾The explanation of the methods of experimental procedure and statistical analysis is the same as the footnote of Fig. 1.

<0.05). 그러나 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 결과 glutathione reductase의 활성이 51.7, 64.2 및 57.6을 나타내어 효소 활성이 높아졌으며 sarcoma-180 세포를 이식하지 않은 각 된장시료의 처리군보다 더 높았다(Fig. 5).

γ -Glutamylcystein synthetase의 활성의 변화는 정상 마우스의 대조군이 5.30을 나타내었고 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 5.37, 5.39 및 5.38을 나타내어 이들 된장추출물로 인한 효소활성의 변화는 거의 없었다. 또한 sarcoma-180 세포를 이식한 마우스의 대조군은 5.24를 나타낸 것에 비해 된장의 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 것은 5.40, 5.45 및 5.41을 나타내어 대조군에 비해 활성증가를 나타내었으나 정상동물에 핵산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 처리한 군에 비하여 활성에 별다른 영향이 없었다 (Table 3). 이상의 결과에서 보면 sarcoma-180 세포의 이식은 glutathione의 함량의 저하로 glutathione S-transferase의 활성도가 감소되는 것으로 생각되며, 이러한 각 된장추출물에 투여에 의한 glutathione의 함량변화는 γ - glutamylcystein synthetase 활성도에 의존하는 것 보다는 glutathione reductase의 활성에 영향을 주어 이로인하여 glutathione 함량을 증가시키고, glutathione S-transferase의 활성도 증가시켜 sarcoma- 180 세포에 의한 독성을 해독하는 것으로 사료된다.

Table 3. Effect of doenjang extracts on hepatic cytosolic γ -glutamylcystein synthetase activity in sarcoma-180 treated or not treated Balb/c mice

| Treatment | Activity |
|---------------------|---------------------------------|
| | Pi formed, nmole/mg protein/min |
| Control | 5.30±0.17 ^a |
| Hexane ext. | 5.37±0.13 ^a |
| Methanol ext. | 5.39±0.12 ^a |
| Boiling ext. | 5.38±0.16 ^a |
| S-180+Control | 5.24±0.21 ^a |
| S-180+Hexane ext. | 5.40±0.17 ^a |
| S-180+Methanol ext. | 5.45±0.14 ^a |
| S-180+Boiling ext. | 5.41±0.12 ^a |

¹⁾The explanation of the methods of experimental procedure and statistical analysis is the same as the footnote of Table 1.

결 론

된장의 추출물들은 정상적인 상태에서 뿐만 아니라 sarcoma-180 암세포에 의한 간 독성을 해독시키는데에는 영향을 주었으며, sarcoma-180 세포에 의해 유발되는 과산화지질의 생성을 저하시키고 이들 세포에 의한 활성산소를 생성하는 효소인 xanthine oxidase 활성을 저하시켰다. 또한 이들 된장 시료에 의해 microsomal oxidizing enzyme인 aminopyrine N-demethylase와 aniline hydroxylase의 활성에 다소 증감이 있었으나 유의성은 없었다. Free radical과 독성 발암물질을 체내에서 무독화시키는 해독기구에 관여하는 효소인 glutathione S-transferase의 활성은 정상 마우스에서는 시료 투여군이 더 낮게, sarcoma-180을 이식한 군에서는 시료투여군이 더 높게 나타나 된장이 비정상적인 상태에서는 free radical의 해독에 영향을 미치는 것으로 보인다. Glutathione 함량은 sarcoma-180 세포를 이식한 마우스에서 대조군에 비해 된장 시료 처리군이 크게 증가되어 된장시료가 활성 산소 및 과산화지질의 해독작용에 영향을 주는 것으로 나타났다. Glutathione의 증감현상을 규명할 목적으로 glutathione reductase 활성과 γ -glutamylcystein synthetase의 활성을 살펴본 결과 glutathione reductase 활성은 정상 마우스에 비해 sarcoma-180 암세포를 이식한 마우스의 경우 더 낮아졌

으나 여기에 각 된장추출물 처리시 활성이 다시 회복되었으며, γ -glutamylcystein synthetase의 활성도에는 각군에서 별다른 영향이 없었다. 이상의 결과에서 된장추출물은 glutathione reductase의 활성을 증가시키고 이것이 glutathione 함량 및 glutathione S-transferase의 활성에 변화를 주어 암세포 성장으로 인한 간기능의 감소를 회복시키며 암의 진전으로 인한 독소물질의 해독작용을 증가시킨다고 사료된다. 된장의 추출물들은 비슷하게 해독효소의 활성을 증진시키고 유해물질 및 유해효소는 감소시키는 효과를 나타내었는데 그 중 메탄올추출물이 가장 효과가 좋았다.

참고 문헌

- 한복려, 한복진. 장 담그는 법. 웅지 1995.
- 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식. 된장의 Aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지 1990; 19: 156.
- 박건영, 문숙희, 이숙희. 된장의 항돌연변이 효과 -된장찌개 및 된장국의 Aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 유발억제효과. 한국환경성돌연변이발암원학회지 1994; 14(2): 145.
- Park KY, Moon SH, Cheigh HS, Baik HS. Antimutagenic effects of doenjang(Korean soy paste). *J Food Sci Nutr* 1996; 1(2): 151.
- 임선영. 된장의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 박사학위논문 1997
- 김문경. Sarcoma-180 투여 마우스에서 재래식 된장의 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1998.
- 이정민. 된장추출물과 Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1993.
- Hayatsu H, Arimoto S, Togawa K, Makita M. Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: Inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutat Res* 1981; 81: 287.
- Begin ME, Das UN, Eils G. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Med* 1985; 19: 177.
- Zhu YP, Su ZW, Li CH. Growth-inhibition effects of oleic acid, linoleic acid and their methyl ester on transplanted tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1302.
- Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC, Bell PRF. Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6 polyunsaturated fats. *Carcinogenesis* 1990; 11(12): 2191.
- 青木. みぞ汁三十不健康法. こま書房 日本 1981.
- Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res (Suppl)* 1983; 43: 2454.
- Weed HG, McGandy RB, Kennedy AR. Protection against dimethylhydrazine- induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1985; 6(8): 1239.
- Messadi DV, Billing P, Shklar G, Kennedy AR. Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76(3): 447.
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, diadzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993; 41(11): 1961.
- Mergen WJ, Bhagavan HN. α -Tocopherols (Vitamin E). In nutrition and cancer prevention. Moon TE and Micozzi MS (ed), Marcel Dekker, Inc, New York, 1989; 305.
- Lee SM, Rhee SH, Park KY. Antimutagenic effect of soluble dietary fiber from kale and soybean. *Environ Mut Carcinogens* 1993; 13(1): 26.
- Stripe F, Della CE. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855.
- Habig WH, Pabist MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70.
- Meister A, Richman PG. Regeneration of γ -glutamylcystein synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 1975; 250: 1422.
- Mize CE, Thompson TE, Langdon RG. Hepatic glutathione reductase: I. purification and general kinetic properties. *J Biol Chem* 1962; 237: 1596.
- Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. *J Biol Chem* 1953; 55: 416.
- Bidlack WR, Lowery GL. Multiple drug metabolism: *p*-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 311.
- Lowry OH, Rosebrouge NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
- Prohaska JR, Ganther HE. Glutathione peroxidase activity of purified rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 76: 437.
- Burk RF, Trumble MJ, Lawrence RA. Rat hepatic cytosolic glutathione dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH-microsomal lipid peroxidation system. *Biochem Biophys Acta* 1980; 618: 35.
- Mirsalis JC, Hamilton CM, Schindler JE, Green CE,

- Dabbs JE. Effects of soya bean flakes and liquorice root extract on enzyme induction and toxicity in B6C3F mice. *Fd Chem Toxic* 1993; 31: 343.
- 30) 박건영, 손미현, 문숙희, 김광혁. *In vitro* 및 *in vivo*에서 된장의 암예방효과. 1. 된장추출물의 항돌연변이 및 *in vivo* 항암효과. *대한암예방학회지* 1999; 4: 68.
- 31) Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 56.
- 32) Karmen A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 131.
- 33) Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351.
- 34) Hayes. Principles and methods of toxicology. Raben Press 1982; 407.
- 35) Wroblewski F, LaDue JS. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Esp Bio Exp* 1956; 91: 569.
- 36) Jakeda Y, Ichihara A, Tanioka H, Inove H. The biochemistry of animal cell, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed in liver cells. *J Biol Chem* 1964; 239: 3590.
- 37) LaDue JS, Wroblewski F, Karmen A. Transaminase activity in human blood. *Science* 1954; 120: 474.
- 38) 윤종국. 흰쥐의 사염화탄소에 간손상시 actinomycin D 및 predisolone이 혈청 xanthin oxidase 활성에 미치는 영향. *계명대학교 기초과학연구소 연구논문집* 1988; 7: 113.
- 39) Bus IS, Gibsin JE. Lipid peroxidation and its role in toxicology. *Review in Biochemical Toxicology*, Elsevier Press, 1975; 125.
- 40) Yukiko Y, Maeda C, Goro C. The effects of neintak thymectomy on the antitumour activity of kentinan, carboxymethylpachymaran and zymosan and their effect on various immune response. *J Cancer* 1973; 11: 153.
- 41) Tubaro E, Banci F, Lotti B, Croce C. Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Areneim Forsch (Drug Res)* 1976; 26(2): 2185.
- 42) Tobaró E, Lotti B, Croce C, Caballo G, Borelli G. Liver xanthine oxidase increase in mice in three pathological models. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 1939.
- 43) Alleu RE, Outhwaite JM, Morris CJ. Xanthine oxidase reductase in present in human synovium. *Ann Rheumat* 1987; 46: 843.
- 44) Kehrer JP, Piper HM, Sies H. Xanthine oxidase is not responsible for preoxygenation injuring in isolated-perfused rat heart. *Free Rad Comms* 1987; 3(1): 69.
- 45) Grem CM, Rasdale RA, Ketai LH, Shlaite, M. Absenil of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 141(3): 1104.
- 46) Schoutseu B, De Jang HW. Age-dependent increase in xanthine oxidase reductase differs in various heart cell type. *Circ Res* 1987; 61: 604.
- 47) Periaman K, Jay LZ. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1986; 264: 880.
- 48) Imai R, Sato R. Evidence for two tumor of P-450 hemoprotein in microsomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 23: 5.
- 49) Levin W, Kuntzman R. Biophasic decreases of radioactive hemoprotein from liver microsomal CO-binding particles. Effect of 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem* 1969; 244: 3671.
- 50) Jakoby WB. A group of multifunctional detoxication proteins. *Adv Enzyme* 1978; 46: 383.
- 51) 土田成記, 佐藤清美. Glutathione S-transferase isozyme, glutathione 研究のエポック. 蛋白質, 核酸, 酵素, 臨時増刊 1988; 33: 1370.
- 52) Sakamoto Y, Kinoshita S. Physiological activity of glutathione (3rd ed). Tokyo, In "Glutathione" 1988; 5.
- 53) Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711.