

亞窒酸鹽이 白鼠의 肝 및 腦組織中 磷脂質組成에 미치는 影響

裴 恩 相

(Received November 15, 1974)

Eun Sang Bae: Effects on the Phospholipid Patterns of Liver- and Brain-Tissues of Albino Rats Treated with Sodium Nitrite.

Abstract—The amount of total lipids and phospholipids in the rat liver and brain after sodium nitrite treatment was measured together with the composition ratio of phospholipids. The results obtained were as follows: 1) The amount of total lipids and phospholipids was decreased significantly and this decrease was more outstanding in the rat brain than liver. 2) The amount of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and sphingomyelin was decreased, whereas that of phosphatidylinositol and diphosphatidylglycerol increased. According to the above described results, it appears that the sodium nitrite treatment of 120mg/kg/day concentration brings inhibition of lipid metabolism in the rat liver and brain.

近來에 亞窒酸鹽이 生體內 酵素系에 미치는 影響에 關한 研究는 Uzoukwu¹⁾ 등의 亞窒酸鹽에 依한 白鼠肝組織內 LDH 및 SDH活性에 미치는 影響, Wachstein等²⁾의 cellular enzyme의 變化에 미치는 影響, Ziegler³⁾의 呼吸酵素 傳達能力에 關한 研究가 報告되었고 Egashira等⁴⁾은 monoamine oxidase의 活性, Buckley等⁵⁾⁶⁾은 LDH活性 및 그 isozyme pattern에 미치는 影響, Wirtz, Dawson 및 McMurray等⁷⁻⁹⁾은 mitochondria와 microsome間的 磷脂質交換 및 磷脂質 pool size에 미치는 影響等에 關한 研究結果를 報告하는等 多數의 報文이 發表되었으나 亞窒酸鹽 投與에 依한 磷脂質生合成에 미치는 影響 및 그 結果에 따른 生體主要器官中 磷脂質組成變化에 對해서는 아직 報告된바 없으므로 著者는 近來 肉類發色劑로 亞窒酸鹽이 許容量 超過使用이 問題視되고 있는 點에 감안하여 特히 重要한 生理活性을 갖인 磷脂質代謝에 미치는 影響을 檢索할 目的으로 亞窒酸鹽 中毒症을 誘發시킨 白鼠의 腦 및 肝組織中磷脂質

From the Department of Sanitation, Junior College of Medical Technology, Korea University, Seoul, Korea.

組成的 變化를 觀察하였다. 本 實驗에서는 minor compound를 除外한 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), sphingomyeline (SPH)과 diphosphatidylglycerol (DPG)만을 定量的으로 測定하여 NaNO_2 投與가 이들 成分에 미치는 影響을 檢索하였다.

그 結果 總脂質量, 總磷脂質量 및 磷脂質組成에 變化를 준다는 事實을 認知하였기에 이에 그 結果를 報告코져 한다.

實 驗

試料採取—— 120mg/kg NaNO_2 를 24時間 간격으로 腹腔內에 注射한 雄性白鼠를 初回投與後 0, 48, 168, 288時間 간격으로 도살하고 腦 및 肝을 即時 摘出하여 試料로 使用하거나 다음 實驗操作時까지 N_2 -gas下에서 -20° 로 冷凍保存하였다.

脂肪抽出——抽出은 N_2 -gas로 deaeration한 溶媒를 使用하였고 cell-homogenizer를 使用하여 組織檢體의 20倍容量에 該當하는 CHCl_3 : MeOH(2:1)混液으로 10分間 攪拌하여 抽出하고 濾過殘渣를 다시 10倍容量의 같은 溶媒 system으로 5分間 抽出하고 다시 濾過하여 殘渣를 10倍容量의 CHCl_3 : MeOH(1:2) 混合溶媒로 抽出하고 最終으로 濃 ammonia로 飽和시킨 CHCl_3 : MeOH(7:1)(約5.5v/v%)로 抽出하고¹⁰⁾ 全抽出液을 합친후 rotary evaporator를 使用하여 N_2 -gas 氣流下에서 加熱하지 않고 溶媒를 증류시켰다. 全實驗操作過程을 通해 溶媒의 完全蒸溜는 物質의 不安定性때문에 피하였다. 蒸溜途中 析출된 變性 proteolipid¹¹⁾는 G-3 glass filter를 使用하여 여과하였다. 이와같이 抽出한 粗脂肪은 Folch¹²⁾法에 따라 非脂肪性物質을 除去하였다.

Column Chromatography—— Silicagel 60 (E. Merck)을 吸着劑로 使用한 column(2.5×30cm)을 使用하여 中性脂質, 糖脂質 및 磷脂質로 分離하였는데 中性脂質은 10 column-volume에 該當하는 量의 CHCl_3 으로 糖脂質은 40 column-volume의 acetone으로 磷脂質은 10 column-volume의 MeOH로 完全分離 溶出되었으며 이 過程은 薄層 chromatography로 monitoring하였다. column當 檢體處理量은 約 100~200mg이었다.

磷脂質分劃分을 定量的으로 取하여 溶媒를 증발시켜 全體溶量을 一定 volume으로 한 후 薄層 chromatography에 依해 個別 磷脂質을 分離, 同定, 定量하였다.

薄層 Chromatography——吸着劑로는 Silicagel H (E. Merck):Magnesium silicate (Woelm) (9:1)¹³⁾의 混合物를 使用하였고 活性化는 使用直前に 110° 에서 30分間 行하였다. 展開는 溶媒 system¹³⁾ CHCl_3 : MeOH: 28% NH_4OH (65:35:5)와 CHCl_3 : Me_2CO : MeOH: AcOH: H_2O (5:2:1:1:0.5)를 利用한 2次元 展開法을 使用하였다.

磷脂質의 確認——薄板上에 分離된 磷脂質의 確認 (Fig I, Table I)은 標準物質과 對比한 Rf 值的 確認과 dichromate- H_2SO_4 試液¹⁴⁾, phosphomolybdenic acid 試液¹⁵⁾, Ninhydrin 試液¹⁶⁾

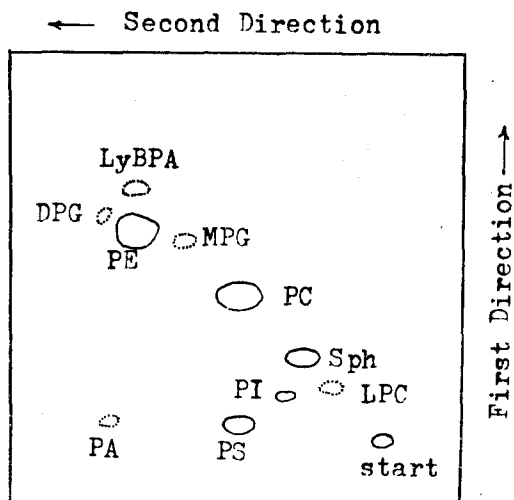


Fig.I—Thin layer chromatogram of rat liver phospholipids.

TLC developed in the first dimension with CHCl_3 : MeOH: 28% NH_4OH (65 : 35 : 5) and in the second dimension with CHCl_3 : Me_2CO : MeOH: AcOH: H_2O (50 : 20 : 10 : 10 : 5)

Abbreviations: PA, phosphatidic acid; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol;

LPC, lysophosphatidylcholine; Sph, sphingomyelin; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; MPG, monophosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; LyBPA, lysobisphosphatidic acid.

Table I— R_f values and identifications of phospholipids.

Substances	R_f values with developing solvents			Detection
	acidic	neutral	alkaline	
Phosphatidylcholine	0.31	0.34	0.35	1, 3, 4, 5
Phosphatidylethanolamine	0.48	0.50	0.60	1, 2, 3, 4, 5
Phosphatidylserine	0.25	0.30	0.02	1, 2, 3, 4, 5
Phosphatidylinositol	0.19	—	0.13	1, 4, 5
Diphosphatidylglycerol	0.53	0.78	0.62	1, 4, 5
Sphingomyelin	0.20	0.23	0.23	1, 2, 4, 5

Detection: 1, Dichromate-sulfuric acid; 2, Ninhydrin; 3, Dragendorf; 4, Phosphomolybdenic acid; 5, Vaskopsky & Kostetsky.

Dragendorf試液¹⁶⁾, Vaskopsky & Kostetsky 試液¹⁷⁾ 등의 發色試液을 補助的으로 使用하였고 定量時에는 I_2 -증기를 使用하였다.

磷脂質의 定量¹⁸⁾——磷脂質의 定量은 그에 含有된 P를 定量하였다. 薄板上에 分離된 磷脂質을 I_2 -증기로 發色시킨 後 spot를 表示하고 加熱에 依해 I_2 를 除去시킨 後 吸入장치를 利

用하여 磷脂質 spot를 silicagel과 함께 0.5ml 濃 HCl과 0.5ml 蒸溜水를 미리 채운 遠心分離管(12mm×12cm)에 옮겼다. 油浴上에서 溫度를 徐徐히 上昇시키면서 水分과 HCl을 증발시키고 約 180°에서 20分間 乾燥시켰다. 冷却後 0.45ml의 70% HClO₄를 加하고 約 180°에서 20分間 加熱하여 灰化시키고 冷却後 증류수 2.5ml, 2.5% ammonium molybdate 溶液 0.5ml와 10% ascorbic acid 溶液 0.5ml을 잘 섞어서 흔들어준 다음, 5分間 沸騰水浴上에서 加熱後 遠心分離하고 上澄液을 820nm에서 吸光度를 測定하고 檢量曲線으로부터 P의 量을 求하였다. 空試驗은 P를 含有치 않은 同一板의 silicagel을 使用하여 行하였다. 檢量曲線은 Na₂HPO₄를 使用하고 同一操作을 行하여 作成하였다.

結果 및 考察

NaNO₂ 投與群의 肝 및 腦組織中 總脂質量 및 總磷脂質量—Table II에 表示한 바와 같이 投與群의 肝 및 腦組織中 總脂質量 및 總磷脂質量은 投與後 時間의 經過에 따라 減少를 보였는데 NaNO₂投與開始 12日 經過後 總脂質量은 肝組織中에서 約 50% 腦組織中에서 約 96%가 減少하였고 總磷脂質量은 肝組織中에서 約 40%, 腦組織中에서 約 60%가 減少하였다. 總脂質量 및 總磷脂質量은 肝組織의 경우가 腦組織보다 完만한 減少를 보였다.

Table II—Total lipids and phospholipids-phosphorus in rat brain and liver.

Treatment	Lipids	Control	Percentage after initial treatment		
			48hrs	168hrs	288hrs
120mg NaNO ₂ /kg <i>i.p.</i> ā 24hrs.	Total lipid*	12.5±0.5	6.5±0.2	2.8±0.4	0.5±0.1
	Phospholipid-P**	2.5±0.2	1.4±0.2	1.3±0.1	0.8±0.2
120mg NaNO ₂ /kg <i>i.p.</i> ā 24hrs.	Total lipid*	4.1±0.2	3.6±0.2	2.0±0.4	1.2±0.1
	Phospholipid-P**	2.8±0.4	2.5±0.2	2.4±0.1	1.7±0.3

* Mean±S.D. to the fresh weight of organ.

** Mean±S.D. to total lipids.

NaNO₂ 投與群의 肝 및 腦組織中 磷脂質組成比—投與群의 肝 및 腦組織中 總磷脂質量에 對한 PC와 PE는 그 組成比가 減少하고 PI, PS 및 DPG는 오히려 增加되었는데 絶對增減率에서는 PI만이 130%의 實質的 增加를 보였으며 其外는 모두 減少하였다.

NaNO₂ 投與開始 12日 經過後 腦組織中 PC는 對照群 22%에 比해 12%로 PE는 33%에서 24%로 그 組成比가 低下되었으며 PI, PS 및 DPG는 約 4.0%, 14.0%, 0.7%에서 約 16.0%, 22.0%, 2.0%로 그 組成比가 增加되었다. 肝組織中 PC는 對照群에서 45%가 17%로 PE는 22%에서 18%로 되어 PC가 PE보다 훨씬 組成比의 變化가 크다. PI, PS 및 DPG는 8.0%, 3.5%, 4.6%에서 32%, 6.4%, 11.5%로 增加했고 絶對增減率은 PE, PC 및 SPH는 減少했으나 PI, PS 및 DPG는 增加하였다.

Table III— Content variations of the rat liver and brain phospholipids after NaNO₂ treatment.

Treatment	Phospholipids	Percentage after initial treatment			
		Control	48hrs	168hrs	288hrs
120mg NaNO ₂ /kg <i>i.p.</i> ā 24 hrs	Phosphatidylcholine	45.5±0.3*	38.0±0.5	36.1±0.3	16.7±0.2
	Phosphatidylethanolamine	22.0±0.1	19.5±0.6	18.7±0.4	18.0±0.4
	Phosphatidylinositol	8.1±0.2	16.6±0.4	17.8±0.3	32.0±0.5
	Phosphatidylserine	3.5±0.3	4.8±0.2	4.7±0.1	6.4±0.3
	Sphingomyelin	4.5±0.2	4.2±0.3	4.4±0.2	4.5±0.1
	Diphosphatidylglycerol	4.6±0.1	5.2±0.3	7.8±0.3	11.5±0.3
120mg NaNO ₂ /kg <i>i.p.</i> ā 24 hrs	Phosphatidylcholine	22.2±0.2	15.1±0.4	15.0±0.3	12.4±0.3
	Phosphatidylethanolamine	33.0±0.6	27.1±0.2	25.0±0.4	24.1±0.1
	Phosphatidylinositol	3.9±0.3	12.4±0.5	12.9±0.1	15.8±0.2
	Phosphatidylserine	13.9±0.2	18.6±0.3	19.3±0.6	22.0±0.5
	Sphingomyelin	15.5±0.5	16.1±0.4	15.9±0.3	16.0±0.4
	Diphosphatidylglycerol	0.7±0.1	1.3±0.1	1.4±0.2	2.2±0.2

* Mean±S.D.

以上の實驗結果를 綜合할 때 NaNO₂投與群에서 PC와 PE가 特히 減少하고 PI와 DPG가 오히려 增加하는 點으로 보아 phosphatidic acid로부터 α,β -diglyceride의 活性化經路에 阻害를 주는 것으로 推定해 볼수 있는데 SPH의 減少가 일어나는 點으로 보아 各 過程에 關與하는 酵素 system에 着眼할때 choline— 또는 ethanolamine monophosphate로 되는 第一단계 活性化 過程에 影響을 주는 것으로 推定된다. 또한 總磷脂質量의 減少도 α -glycerophosphate의 生成過程에 關與하는 酵素反應系에 影響을 주는 것으로 思料된다. 以上の 實驗結果는 總磷脂質의 pool size를 phenobarbital을 投與함으로써 增加시킨다고 報告한 Wirtz 및 Zilversmit의 實驗結果와 對照的이다.

結 論

1. 白鼠의 腦 및 肝組織中 總脂質量 및 總磷脂質量은 亞窒酸鹽 投與에 依해 顯著히 減少하고 肝組織에서보다 腦組織에서의 減少率이 크다.
2. 亞窒酸鹽投與에 依해 白鼠의 腦 및 肝組織中의 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine과 sphingomyelin은 그 絶對含量이 減少하였고 phosphatidylinositol과 diphosphatidylglycerol은 增加하였다.

以上の 結果를 綜合할때 NaNO₂ 120mg/kg/day 投與濃度에서 白鼠의 腦 및 肝組織에 있어서 脂質代謝를 阻害함을 認知하였다.

文 獻

1. M. Uzoukwu, *Amer. J. Vet. Res.*, **31**, 321 (1970).
2. M. Wachstein and E. Meisel, *J. Hist. Chem.*, **5**, 204 (1957).
3. F.D. Ziegler, *Am. J. Physiol.*, **212**, 197 (1967).
4. T. Egashira, K. Takano, K. Shimizu, Y. Kurosawa and K. Kamijo, *Japan. J. Pharmacol.*, **21**, 274 (1971).
5. R. D. Buckley and O.J. Balchum, *Arch. Environ. Health*, **10**, 220 (1965).
6. R.D. Buckley and O.J. Balchum, *ibid.*, **14**, 424 (1967).
7. K.W.A. Wirtz and D.B. Zilversmit, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 105 (1969).
8. W.C. McMurray and R.M.C. Dawson, *Biochem. J.*, **112**, 91 (1969).
9. K.W.A. Wirtz and D.B. Zilversmit, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3596 (1968).
10. G. Rouser, G. Kritchevsky, D. Heller and E. Lieber, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 425(1963).
11. H.Singh and O.S. Privett, *Lipids*, **5**, 692 (1970).
12. J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1958).
13. G. Rouser, G. Simon and G. Kritchevsky, *Lipids*, **4**, 599 (1969).
14. K. Randerath, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2nd edition, Verlag Chemie, GMBH, 1965.
15. H.P. Kaufmann and Z. Makus, *Fette Seifen, Anstrichm.*, **62**, 1014 (1960).
16. H. Wagner, L. Hörhammer and P. Wolff, *Biochem. Z.*, **334**, 175 (1961).
17. V.E. Vaskovsky and E.Y. Kostetsky, *J. Lipid Res.*, **9**, 396 (1968).
18. G. Rouser, A.N. Siakotos and S. Fleisher, *Lipids*, **1**, 85 (1966).