

# Butylatedhydroxyanisole과 Flavone에 의한 연기성분의 생체내 활성억제에 관한 연구

선우 양일 · 박 기 현

한국연초연구소 껌연과학부

(1980. 10. 10. 접수)

## The Inhibition Effects of Butylatedhydroxyanisole and Flavone on the Microsomal Activation of Cigarette Smoke Components in Rat

Yang Il Sun Wo and Ki Hyun Park

Divison of Smoking and Health  
Korea Tobacco Reserch Institute, Seoul, Korea

(Received Oct. 10, 1980)

### 초 록

연기성분의 생체내 활성을 억제시키기 위하여 Wistar male rat에 담배연기 응축물과 이의 중성분획을 5 mg/kg, 10mg/kg 각각 복강주사한후 경시적으로 Lactic acid dehydrogenase (LDH) activity를 대조군과 비교하여 유해정도를 검토하였다.

그리고 연기성분의 활성억제물질로 선정된 flavone과 butylatedhydroxyanisole(BHA)를 각각 1mg/kg처리하여 그 활성억제정도를 관찰한 결과 flavone처리에 의한 연기응축물의 LDH activity는 전반적으로 현저한 감소현상을 보였으며 12시간후에는 641 unit로서 처리하지 않았을 때의 1040unit에 비하여 괄목할만한 결과를 나타냈다.

그러나 BHA처리에 의한 결과는 flavone보다 다소 저조한 현상을 보였다.

따라서 flavone은 연기응축물의 활성억제에 보다 효과적인 것으로 생각된다.

한편 중성분획처리의 경우는 flavone에 비하여 BHA가 LDH활성도 억제현상을 보였는데 주사후 6~18시간사이에 LDH활성도가 100~200unit의 감소현상을 나타냈다.

그러므로 중성분획에는 BHA가 바람직한 억제물질로 사료된다.

### ABSTRACT

The inhibition effect of flavone and butylatedhydroxyanisole (BHA) on the microsomal activation of Cigarette Smoke Condensate (CSC) or its Neutral Portion (NP) was investigated in Rat.

The activities of Lactic acid dehydrogenase (LDH) in serum was measured in the time intervals of 3, 6, 12, 18, 24 and 30 hr, respectively, after the injection (ip) of CSC (5mg/kg) or NP (10mg/kg) to Wistar male rat.

Flavone (1mg/kg) and BHA (1mg/kg) were injected along with CSC or NP.

The significant enhancement of the LDH activity in serum was observed in both cases of rats treated with CSC and NP.

A drastic decrease of LDH activity from 1040 unit to 641 unit was observed after 12 hours of injection of CSC along with flavone. In contrast with the case of flavone, BHA reduced the enzyme activity from 825 unit to 652 unit at the same condition of flavone.

Therefore, flavone can be considered to be a better inhibitor on action of CSC in vivo.

## 서 론

담배연기성분의 유해정도를 연구하는데 생체 효소의 활성도변화등을 측정하는 방법이 흔히 연구되고 있으며 그 중에서 Lactic acid dehydrogenase (LDH)가 생체의 세포손상에 따라 활성도가 증가<sup>1-4)</sup>되므로서 유해물질에 의한 생체의 이상대사를 검토하고 병리조직학적인 면에서 질병을 진단하는데 유용한 방법으로 LDH 활성도의 변화를 측정하고 있다.<sup>4-9)</sup>

또한 최근에는 종양발생의 진단에까지 LDH 활성도 변화가 Biochemical marker로서 제안되고 있다.<sup>10-14)</sup>

한편 Cheraskin 등<sup>15)</sup>은 인체의 흡연양에 따른 LDH활성도를 관찰한 결과 20 cig/day정도 흡연하는 사람은 10 cig/day미만에 비하여 1.5배의 LDH활성도가 높다고 보고 하였다.

그리고 Wattenberg 등<sup>16)</sup>은 오염된 대기, 식품, 담배연기중에서 흔히 검출되는 benzo(a) pyrene의 생체내 활성억제에  $\beta$ -naphthoflavone, quercetin, rutin 등의 flavonoids계 열화합물이 효과가 있으며 그 중  $\beta$ -naphthoflavone이 가장 강력한 억제물질이라고 지적하였다.

또한 Clinton 등<sup>17)</sup>은 연기응축물의 중성분획에 들어있는 여러 발암성 물질중 7. 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)에 의한 종양 발생이 단백질을 투여한 결과 효과적으로 저지되었

으며 Makee 등<sup>18)</sup>은 Sal. typhimurium의 reversion test에서 식품의 항산화제로서 첨가되는 물질중 butylatedhydroxyanisole (BHA)와 butylatedhydroxytoluene (BHT)가 antimutagenic activity가 있다고 각각 보고 하였다.

Wattenberg, <sup>19,20)</sup> Slaga 등<sup>21)</sup>, King 등<sup>22)</sup>도 DMBA와 그밖의 몇가지 발암물질에 의한 종양발생에서 BHA, BHT가 현저한 억제효과를 나타냈다고 지적하였다.

그러나 위와같은 여러 물질이 들어있는 담배연기의 생체내 활성억제에 관한 연구는 아직 보고된 바 없으므로 본 연구는 항산화제중에서 BHA를, 그리고 flavonoids계 열화합물에서 flavone을 각각 억제물질로 선정하여 응축물 또는 중성분획과 함께 쥐에 복강주사한후 경시적으로 LDH활성도의 변화를 관찰하여 활성억제 물질로서의 효과를 검토한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시 약

Flavone, BHA는 Sigma제를, 그리고 주사용용매로 사용한 참기름은 본 연구실에서 조제한 것을 각각 사용하였다.

한편 LDH Kit는 국제시약주식회사(日)제를 사용하였으며 기타 시약들은 Wako(日)제를 사용하였다.

## 2. 담배연기 응축물 포집과 중성분획의 분리

거북선 양절담배를 자동흡연장치 (Heiner Borgwaldt, Germany)를 사용하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 dry-ice-acetone trap에서 다음과 같은 CORESTA 표준조건에 따라 연기응축물을 포집하였다.

- i) One puff volume : 35ml
- ii) Puff duration : 2 sec (one puff/min)
- iii) Butt length : 23mm

포집된 담배연기응축물을 acetone으로 용해한 후 회전진공농축기를 사용하여 농축하였으며 응축물의 일부를 Swain등<sup>23)</sup>, Hoffman등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 중성분획을 분리하였다.

## 3. 실험동물처리와 Serum 분리

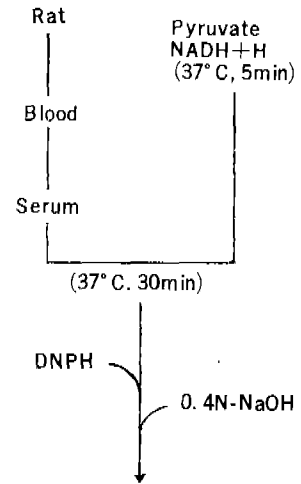
습도60%, 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 표준조건에서 사육한 Wistar male rat(체중, 100g)를 실험동물로 선정하여 연기응축물 ( $\text{LD}_{50}$ , 30mg/kg), 중성분획 ( $\text{LD}_{50}$ , 60mg/kg)을  $\text{LD}_{50}$ 의 농도의 양 즉, 5mg/kg, 10mg/kg을 참기름에 용해하여 각각 복강주사하였으며 BHA(1mg/kg) 또는 flavone(1mg/kg)을 연기성분과 동시에 복강주사 하였다.

한편 대조구는 참기름(4 ml/kg)만을 주사하였다.

채취한 혈액은 heparinized vial에 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $600 \times g$ 에서 10분동안 원심분리한후 상층의 serum중 0.02ml을 취하여 각각의 LDH 활성도 측정용으로 하였다.

## 4. LDH활성도 측정

Wróblewski등<sup>4)</sup>과 Cabaud등<sup>5)</sup>의 측정방법을 수정, 보완하여, 제조한 LDH Kit에 따라 표준곡선을 작성한후 그림 1과 같이  $\text{NADH} + \text{H}^+$ 의 vial에 pyruvic acid substrate 5.5ml을 가하여 용해시킨후 그 중 1ml을 취하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 가열하였다. 이 용액에 혈청 0.02ml을 가한후 혼합하여 다시  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분동안 가열하였다. 그 후 dinitrophenylhydrazine (DNPH) 1ml을 가하여 혼합한후 실온에서 20분 방치하였다. 0.4N-NaOH 10ml을 가하고 10분후에 증류수를 바탕으로하여 Spectrophotometer Cary 17D로 흡



Detn. O. D. at 540nm by spectrophotometer

Fig. 1. Procedure for determination of serum LDH activity.

광도를 측정하였으며 LDH활성도표준곡선에 의하여 시료의 LDH활성도 (unit :  $\mu\text{mole pyruvate} / \text{min} / \text{ml serum}$ )를 산출하였다.

## 결과 및 고찰

표 1 및 그림 2에서 먼저 대조구의 LDH 활성도를 살펴보면 시간경과에 따라 대체로 증가현상을 보이다가 18시간후에는 감소되며 24시간후에 다시 일정하게 증가되는 것으로 미루어 LDH 활성도는 24시간을 주기로 변화되는 듯 하다.

연기응축물은 복강주사후 12시간에 이르러 1000unit 전후의 급격한 증가를 보이다가 18시간부터 현저하게 감소되고있다. 그러나 중성분획은 12~18시간사이에 LDH 활성도가 약 850unit로 최고치에 달하는데 연기응축물과는 달리 경시적인 증가 또는 감소현상이 다소 완만한 결과를 나타냈다.

연기응축물에 의한 LDH활성도의 급격한 증가는 phenols, aldehydes, alkaloids화합물과 기타 유해질소화합물등 급성효과를 나타내는 물질에 의한 것으로 생각되며 이와같은 물질이 제외된 중성분획은 polycyclic aromatic hydrocabons (PAH) 중에서 만성독성을 나타내는 발암성물질과

Table 1. Changes of Serum LDH Activity after the treatment of Cigarette Smoke Condensate (CSC) and its Neutral Portion (NP) on Rat

Time after injection (hr)	LDH activity unit ( $\mu$ mole pyruvate/min/ml serum)		
	Control <sup>a</sup>	CSC <sup>b</sup>	NP <sup>c</sup>
3	312	463	351
6	367	915	708
12	473	1040	852
18	518	764	871
24	341	677	728
30	364	612	495

Intra peritoneal volume : a. 4ml sesame oil/kg body weight

b. 5mg/kg, c. 10mg/kg

Each values represent duplicate detns.

그 밖의 여러 물질들에 의해 완만한 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

한편 연기응축물과 중성분획을 각각 복강주사한 후 flavone을 처리하였을 때 LDH 활동도의 경시적인 변화는 표 2 및 그림 3 과 같다. flavone 처리에 의한 연기응축물의 경우 처리하지 않은 것

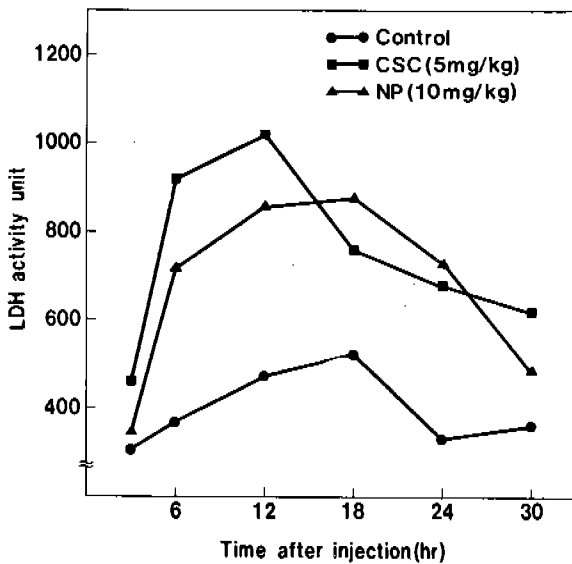


Fig. 2. Changes of the LDH activity in serum as a function of time after ip injection of CSC and NP in rat.

Table 2. The inhibition effect of Flavone on the Serum LDH Activity after the treatment of Cigarette Smoke Condensate (CSC) and its Neutral Portion (NP) on Rat.

Time after injection (hr)	LDH activity unit ( $\mu$ mole pyruvate/min/ml serum)		
	Control <sup>a</sup>	Flavone <sup>b</sup>	
		CSC <sup>c</sup>	NP <sup>d</sup>
3	312	381	327
6	367	608	662
12	473	641	730
18	518	677	848
24	341	610	751
30	364	532	632

Intra peritoneal volume : a. 4ml sesame oil/kg body weight, b. 1mg/kg,

c. 5mg/kg, d. 10mg/kg

Each values represent duplicate detns.

에 비하여 6~12시간의 LDH활성도가 915~1040에서 608~641unit로 상당히 감소된 결과를 보이고 있다. 그 이후의 경향은 큰 차이를 나타내지 않았으나 12시간까지의 결과에서 식물성 식품등에 널리 분포되어 있는 flavone 은 연기응

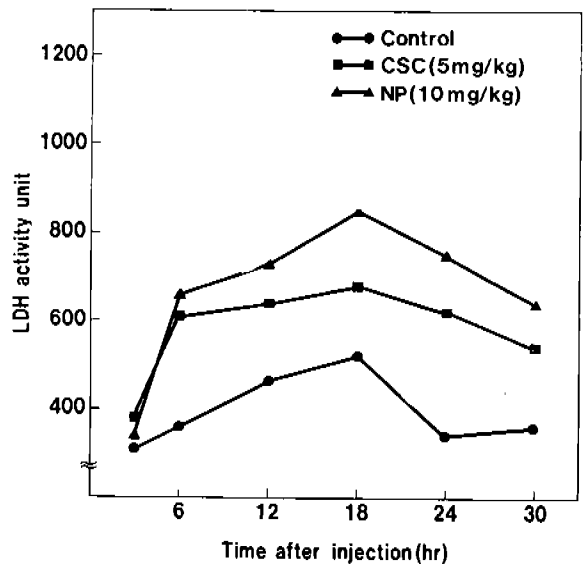


Fig. 3. Changes of the LDH activity in serum as a function of time after ip injection of CSC and NP with Flavone (1mg/kg) in rat.

축물의 생체내 활성억제에 효과적인 물질로 생각된다. 따라서 위에 지적한 급성의 영향을 주는 연기성분들에 의해 나타나는 결과로 생각되는 주사후 12시간사이의 LDH활성도감소가 flavone에 의한 것으로 사료된다.

그리고 그 이후 LDH활성도가 뚜렷한 감소가 없는 것으로 미루어 볼때 만성적 영향을 주는 물질들에는 큰 효과가 없는것같다. 이와같은 현상은 flavone을 처리한 중성분획의 LDH 활성도 변화를 비교했을때 나타나고 있다.

그러나 같은 조건에서 BHA를 처리했을때 표 3 및 그림 4에서 보는 바와같이 flavone에 의한 결과와는 달리 중성분획의경우 LDH활성도가 6~18시간사이에 상당히 감소했으며 그 후의 경시적인 변화는 연기응축물만을 처리했을때와 유사한 경향을 보였다. 따라서 중성분획의경우 flavone보다는 BAH가 LDH활성도를 좀 더 감소시킴으로서 결과적으로 생체내 활성억제에는 BHA가 효과적인 것으로 생각된다. 이와같은 현상은 PAH계 열화합물중 만성적인 영향을 미치는 발암성 물질이 다량 함유된 중성분획인 것을 고려할때 Watterberg<sup>19,20)</sup> Slaga등<sup>21)</sup> King등<sup>22)</sup>의 보고와 일치한다.

Table 3. The inhibition effect of BHA on the Serum LDH Activity after the treatment of Cigarette Smoke Condensate(CSC) and its Neutral Portion(NP) on Rat.

Time after injection (hr)	LDH activity unit ( $\mu$ mole pyruvate/min/ml serum)		
	Control <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>	
		CSC <sup>c</sup>	NP <sup>d</sup>
3	312	408	352
6	367	815	606
12	473	750	620
18	518	698	714
24	341	662	707
30	364	563	412

Intra peritoneal volume : a. 4ml sesame oil/kg body weight, b. 1mg/kg, c. 5mg/kg, d. 10mg/kg.

Each values represent duplicate detns.

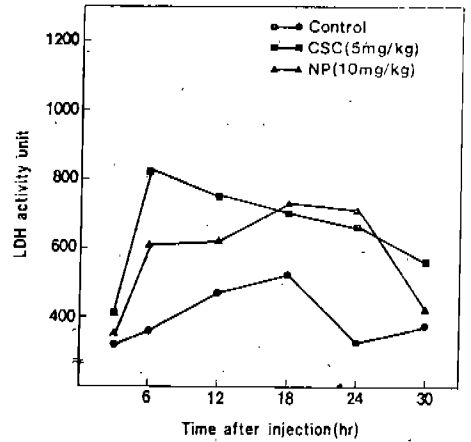


Fig. 4. Changes of the LDH activity in serum as a function of time after ip injection of CSC and NP with BHA (1mg/kg) in rat.

한편 연기응축물의 경우 BHA에 의한 효과는 flavone보다 전반적으로 LDH활성도가 높았으며 특히 주사후 6~12시간사이의 활성도는 상당한 차이를 보였다. 따라서 연기응축물의 활성억제에는 flavone이 바람직한 물질로 생각된다.

## References

- Schmidt, E., and Schmidt, F. W., *Enz. Biol. Clin.*, 3, 75 (1963)
- Thomson, W. H. S., *Clin. Chim. Acta.*, 21, 469 (1968)
- Ludvigsen, B., and Taylor, A., *Adv. Automated Analysis*, 3, 15 (1970)
- Wroblewski, F., and La Due, J. S., *Proc Soc. Exper. Biol. and Med.*, 90, 210 (1955)
- Cabaud, P. G., and Wroblewski, F., *Am. J. Clin. Pathol.*, 30, 274 (1958)
- Annino, J. S., *ibid*, 46, 397 (1966)
- Grick, J. H., *ibid*, 52, 320 (1969)
- Nick, M. P. and Charles, A. H., *J. Thoracic and Cardicvascular Surgery*, 76, 173 (1978)
- Louis, M., Anthea, K., and Clande, P., *Am.*

- J. Clin, Pathol 68, 587 (1977)
10. Robert, E. B., Steven, C. H., and William, L. M., Can. Res., 38, 2773 (1978)
  11. Pesce, A. J., Buble, H. C., Dipersio, L., and Michael, J. G., ibid, 37, 1998 (1977)
  12. Finn, E. E., Am. Concer Soc., 41, 648 (1978)
  13. Saravanan, C. S., Balasubramanian, M. K., and Gopalakrishnan, V., Ind, J. Cancer, 14, 38 (1977)
  14. Chung, L., Lyda, O., Elmen, L. C., and Ryoichi, O., J. Nat. Cancer. Inst., 62, 193 (1979)
  15. Cheraskin, E., Ringsdorf, W.M., and Romano, D, M., J. Int. Acad prev. Med., 15(1976)
  16. Wattenberg, L. W., and Leong, J. L., Can. Res., 30, 1922 (1970)
  17. Clinton S. K., Truex, C. R., and Visek, W. J., J. Nutri., 109, 55 (1979)
  18. Mckee, R. H., and Tomestsko, A. M., J. Natl. Cancer Inst., 63, 473 (1979)
  19. Wattenberg L. W., ibid, 48, 1425 (1972)
  20. Wattenberg, L. W., ibid, 50, 1541 (1973)
  21. Slaga T. J., and Bracken, W. M., Can, Res., 37, 1631 (1977)
  - 22 : King, M. M., Balley, D. M., Gihson, D. D., Ditha, J. V., and paul, B. M., J. Natl. Cancer Inst., 63, 657 (1979)
  23. Swain, A. P., Cooper, J. E., and Stedman, R. L., Can. Res., 29, 579 (1969)
  24. Hoffman, D. and Wynder, E. L., Cancer, 27, 848 (1971)