KOREAN J. FOOD & NUTRITION
Vol 12. No. 2 (1983)

생체 활성Amine이 Aldehyde Oxidase활성에 미치는 영향

김 석 환

동아대학교 식품영양학과

(1983년 2월 26일)

Effect of Biogenic Amines on the Hepatic Aldehyde Oxidase Activity in Rabbit

Seok-Hwan Kim

Dept. of Food & Nutrition Dong-A University

(Received February 26, 1983)

Abstract

The present study was undertaken to elucidate the effect of Serotonin and Norepinephrine on Aldehyde Oxidase activity in rabbit liver, in vitro.

The results were as follows;

1. Aldehyde Oxidase was measured optimum substrate concentration at 5×10^{-4}M and incubation time for 10 minutes.
2. Aldehyde Oxidase were inhibited by Serotonin and Norepinephrine.
3. It was observed that relationship between biogenic amines and substrate were competitive inhibition on Aldehyde Oxidase.

序 論

술은 社交界를 비롯하여 日常生活과 密接한 關係를 가지고 있으며, 國民經濟成長과 더불어 ethanol 消費量이 增加되며 이로 因하여 ethanol性 疾患이 注目의 對象이 되고있다. [1-4]

그 하나의 原因으로써, ethanol의 一次的 代謝産物인 acetaldehyde가 生体內의 活性 amine과 縮合하여 TIQ(tetrahydro isoquinoline)가 形成되며, 이 物質은 아편alkaloid의 morphine의 전구물질과 構造가 類似하기 때문에, ethanol攝取로 일어나는 여러가지 問題와 또한 慢性alcohol中毒을 일으키는 原因物質로 알려져 있다.[5-7] 한편 神經末端에서 遊離되는活性amine들은 MAO(mono amine oxidase)에 依하여 酸化되어 aldehyde형으로 되었다가 aldehyde oxidase나 aldehyde dehydrogenase에 依하여 代謝되어 体外로 排泄되어진다.[8]

이상과 같은 事實들은 미루어 볼 때 生体活性amine과 acetaldehyde, 그리고 兩者의 代謝에 關與하는 酵素들간의 相互關係를 研究하는 것은 매우 意義있는 것이라 사료되어진다.

本 研究는 이러한 생각에서 活性 amine으로써 5-hydroxytryptamine(Serotonin)과 norepinephrine 을 對象으로 하여 aldehyde oxidase活性에 미치는 影響을 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 試 藥

N-methlnicotinamide(Sigma製)
Norepinephrine d-bitartarate(Sterling-Wintrop製)
Pyridone(Merck製),
Serotonine(Sigma製),
그 외 모든 試藥은 市中에서 구입한 特級 및 一級試藥을 使用하였다.

2. 動 物

体重 約1.5~2kg의 成熟한 家兎를 本 大學의 動物舍에서 일정한 飼料와 條件에서 飼育하였으며, 實

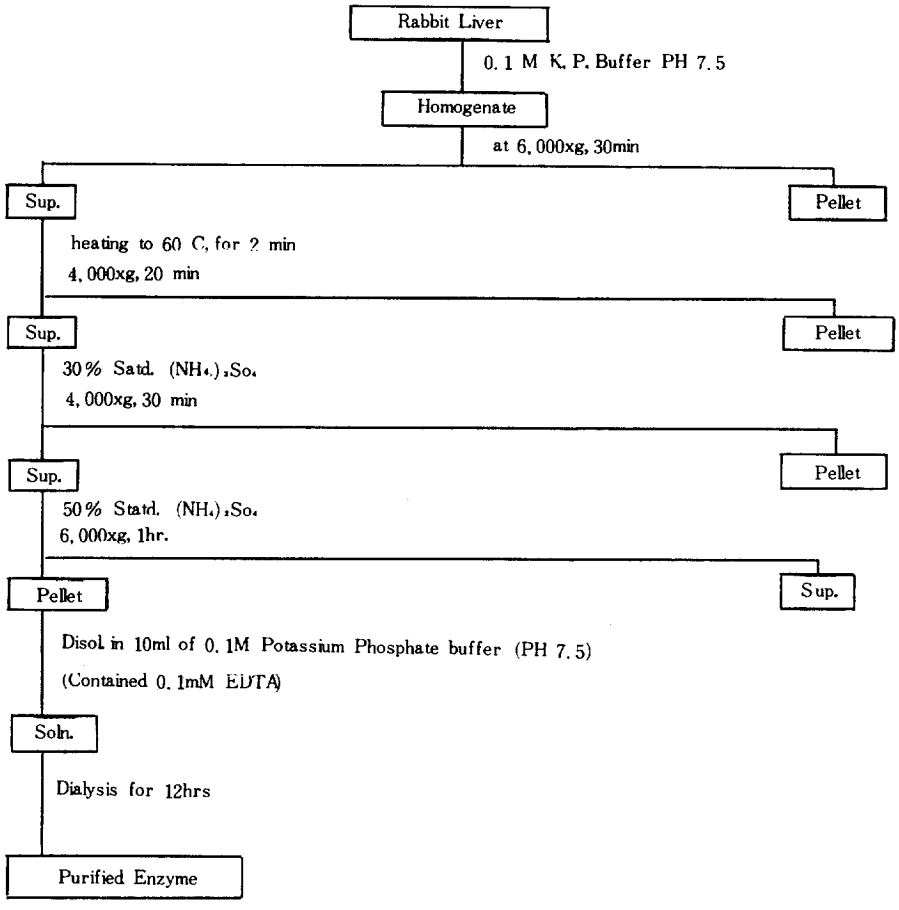
驗前 24時間 물만 주고서 아래의 實驗을 行하였다.

3. Aldehyde oxidase의 酵素調製 및 精製

家兎의 頭部를 강타하여 屠殺시킨 후 肝臟을 摘出하여 氷冷의 生理食塩水에 씻은 후 여지로써 血液 및 기타 附着物質을 吸着 除去하였다. 그리고 그 一定量을 秤量한 다음 肝臟 1g當 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 4㎖을 加하여 Potter Elvehjem Homogenizer로써 마쇄하였다. 이 현탁액을 4℃에서 6000xg로 30分間 遠心分離하여 그 상등액을 取하였다.

酵素의 部分精製는 上記의 試料를 60℃에서 2分間 加温한 후 遠心分離하여 그 상등액에 ammonium sulfate를 加하여 30% 溶液으로 飽和시켰다. 20分間 放置후 4000xg에서 30分間 遠心分離 그 상등액을 取하여 ammonium sulfate로 50% 飽和토록 하였다.

그 후 1時間 放置한 다음 6000xg에서 1時間 再遠心分離시킨 다음 그 침전물을 0.005% veresen-Fe^{+3}含有한 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 10㎖에 녹여 이것을 4℃에서 200배의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 속에서 約10時間 투석시킨 것을 部分精製酵素의 試料로 使用하였다.



Scheme 1. Procedure of enzyme preparation.

4. Aldehyde oxidase의 酵素活性測定

Johns의 方法[9]에 準하여 反應液은 4㎖가 되게 하였다.

反應液의 조성은 potassium phosphate buffer(0.127M), 基質인 N-methylnicotinamide(10^{-4}M) 및 精製酵素(0.1㎖)가 含有되도록 하였다. 이 反應液

을 37℃에서 5分間 反應시킨 후 20% trichloroacetic acid 0.5㎖를 加하여 反應을 종료시킨 다음 4000xg에서 20分間 遠心分離하여 蛋白質을 除去하였다. 그리고 그 상등액中의 pyridone을 波長 300 nm에서의 吸光度變化를 分光光度計(Model: Perkin-Elma139)로 測定하여 精製된 aldehyde oxydase의活性을 檢討하였다.

酵素의 活性度는 1時間에 1mg의 蛋白質이 生成한 Pyridone의 n moles로써 表示하였으며 蛋白質의 定量은 Biuret[10] 및 Lowry[11] 法에 準하여 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 測定하였다.

結 果

1. 部分精製에 따른 aldehyde oxidase의 活性

試料의 部分精製 과정에서 取한 各 분획별 aldehyde oxidase의 活性은 Table 1.에 表示하였다. 현탁액분획에서 酵素의 活性은 30n moles pyridone/mg protein/hr. 이었으며, 최종단계인 투석분획보다 約 20배정도 本 酵素活性이 增加되었다.

Table 2. Comparison of the activities of enzyme fraction in the process of partial purification.

Purification step	Protein Conc. (mg/ml)	Enzyme Specific Activity *
Homogenate	44	30
6,000xg Centrifugation	35	46.2
Heating to 60℃ for 2 min	19	126
Ammonium sulfation	10	276
Dialysis	8.25	606

* : Pyridone moles/mg protein/hr.

2. 部分精製酵素의 Vmax 測定

基質濃度에 따른 酵素活性을 관찰한 성적은 Fig. 1에 圖示하였다.

反應液中의 基質濃度를 變化시켜 가면서 本 酵素의 最高反應速度를 볼 때 5×10^{-4}M부근에서 Vmax를 나타내었다. 그러므로 本 實驗에서는 충분한 濃度로 생각되어지는 5×10^{-4}M을 가지고서 다음의 實驗을 行하였다.

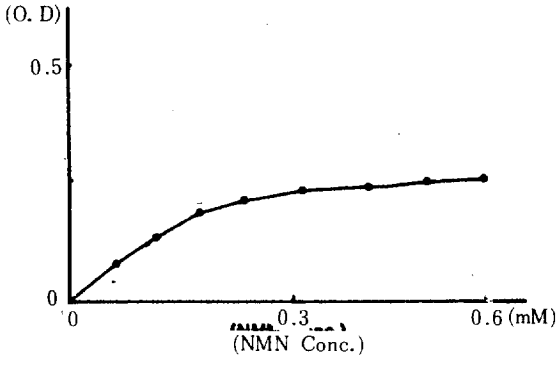


Fig 1. The relationship between NMN Concentration and rate of pyridone formation

3. 時間의 經過에 따른 aldehyde oxidase活性의 影響

本 酵素의 反應時間에 따른 酵素活性의 變化를 Fig. 2에 表示했다.

基質濃度 5×10^{-4}M를 使用하여 反應時間에 따른 酵素活性度를 測定한 結果, 時間의 經過에 따라 直線的으로 酵素의 活性이 增加됨을 관찰할 수 있었다.

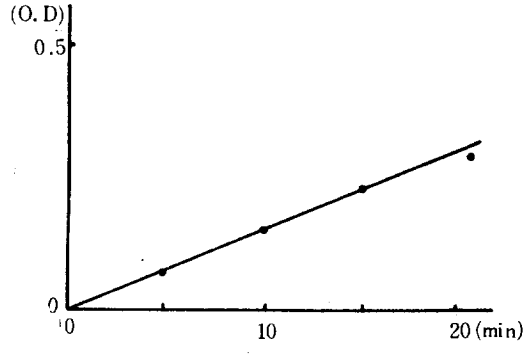


Fig 2. Time course for the pyridone formation

4. 活性amine이 aldehyde oxidase에 미치는影響

活性amine, 즉 Serotonin과 Norepinephrine이 本 酵素活性에 어떠한 影響을 주는가를 관찰한 성적은 Fig. 3과 같다.

反應液中에 Serotonin 10^{-4}M과 Norepinephrine 10^{-4} M을 各各 첨가하여 酵素의 活性을 測定한 結果, 對照群에 비하여 各各 55% 및 48%로 억제되었다.

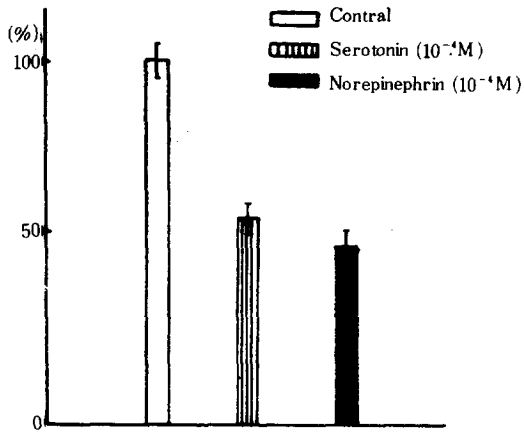


Fig 3. Effect of serotonin and norepinephrine on aldehyde oxidase activity

5. SerotoninOl Michaelis constant에 미치는 影響

Serotonin이 本 酵素의 活性을 억제시키는 기전을 檢討할 目的으로 Lineweaver-Burkplot를 取하여 Fig 4에 表示했다.

基質의 濃度를 변경시키면서 Serotonin 10^{-4}M을 첨가하여 본 結果, 종축에서 서로 交又하였다. 이로 보아 Vmax는 變化하지 않으나 Km은 증가하므로 Serotonin은 경쟁적으로 本 酵素의 活性을 억제하는 것 같았다.

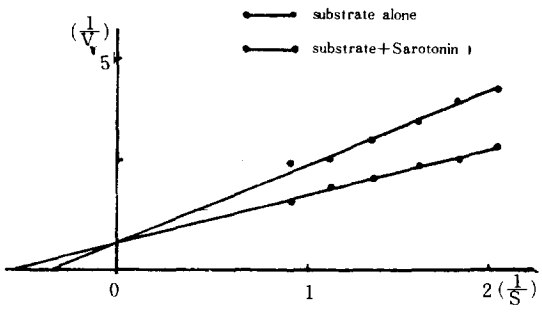


Fig 4. Lineweaver-Burk plot of Aldehyde Oxidase activity with serotonin as a inhibitor

6. Norepinephrine이 Michaelis constant에 미치는 影響

Norepinephrine에 미치는 本 酵素의 억제효과를 檢討하기 위하여 Lineweaver-Burk plot를 取하여 Fig. 5에 表示했다.

Norepinephrine의 경우에서도 종축에서 交又하였으므로 Norepinephrine도 本 酵素의 活性을 경쟁적으로 억제할 것으로 사료된다.

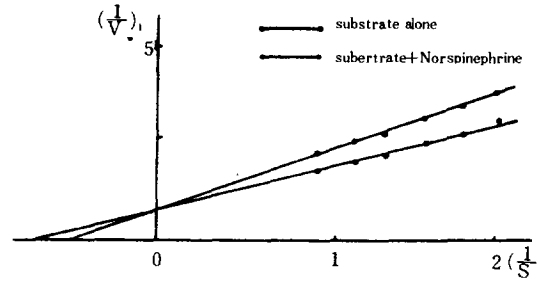


Fig 5. Lineweaver-Burk plot of Aldehyde Oxidase activity with Norepinephrine

考 察

Alcohol의 慢性中毒症狀을 일으키는 原因에 對하여는 아직 未知의 分野가 많다. 一般的으로 alcohol 投與후에 나타나는 生体의 變化는 主로 그 代謝産物인 acetaldehyde에 依한 作用이라고 알려져 있다.[12-14] Acetaldehyde는 生体內에서 aldehyde dehydrogenase와 aldehyde oxidase에 依하여 acetic acid로 酸化되어진다.[8] 또한 生体活性amine들도 生体內에서 酸化되어 aldehyde형으로 되는데[15], 이 biogenic aldehyde가 上記活性amine들의 代謝를 調節할 것이라고 Sharman等[16]은 示唆하였다. 또 이 biogenic aldehyde는 다시 acetaldehyde hydrogenase에 依하여 代謝되어지므로, 本 研究에서는 뇌(Brain)에서 확발한 作用을 갖는 Serotonin과 Norepinephrine을 가지고 aldehyde oxidase에 미치는 影響을 檢討하였던바, N-methylnicotinamide를 基質로 했을 경우 50% 억제농도는 兩者 共히 10^{-4}M부근이었다.

이와같은 억제효과의 Kinetics를 檢討한 結果, 兩者 모두 경쟁적억제를 하고 있음을 관찰할 수 있었다.

本 實驗結果에서 活性amine들이 aldehyde oxidase 活性을 경쟁적으로 억제함은 명백한 事實이나, 어떤 기전에 依하여 이러한 結果가 초래되며, 또한 生体內에서의 作用여부및 그 양상은 앞으로 시행해야할 課題로 남아있다.

本 實驗성적을 통해 生体活性amine과 aldehyde, 그리고 aldehyde oxidase의 관계를 관련지어 慢性 alcohol中毒의 原因규명과 그 예방법을 硏究하는 하나의 실마리를 얻었다고 생각하며, 이 問題에 對해서는 계속 추구하고 硏究할 課題이다.

要 約

實驗動物의 肝臟을 摘出하여 aldehyde oxidase를 精製하고, 이 精製酵素에 對하여 生体活性 amine인 Serotonin과 Norepinephrine이 이 효소에 미치는 影響을 관찰한 성적은 다음과 같다.

1. Aldehyde oxidase測定에 있어서 基質인 N-methylnicotinamide의 最適濃度는 5×10^{-4}M이었으며 反應時間은 10分정도이었다.

2. Serotonin과 Norepinephrine은 本 酵素活性에 억제적으로 作用하였다.

3. Serotonin과 Norepinephrine이 本 酵素活性을 억제시키는 것은 各各 경쟁적인 억제작용이었다.

文 献

1. Lieber, C. S., Sprit, N. and Decarle, L. M. : *J. Clin Invest*, **41**, 1863 (1963)
2. Hawkins, R. D., Kalaut, H. and Khanna, J. H. : *Can. J. Physiol pharm.*, **44**, 241 (1966)
3. Rubin, E., Hutterer, F. and Lieber, C. S. : *Science*, **159**, 1469 (1968)
4. Cederbaum, A. I., Lieber, C. S. and Rubin, E. : *Arch. Biochem. Biophy.*, **161**, 26 (1974)
5. Davis, U. E. and Walsh, M. J. : *Science*, **167**, 1005 (1970)
6. Cohen, G. : *Biochem. Pharmacol*, **20**, 1757 (1971)
7. Sandler, M., Carter, S. B., Hunter, K. K. and Sterin, G. M. : *Nature*, **241**, 439 (1973)
8. Dajani, R. M. and Saheb, S. E. : *Ann. N. Y. acad. Sci.* **251**, 120 (1973)
9. Johns, D. G., Spector, T. and Robins, R. K. : *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 2371 (1969)
10. Allen, G. G., Bardawell, C. J. and David, M. M. : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 255 (1951)
12. Kiessling, K. H. : *Exp. Cell. Res.*, **30**, 569 (1963)
13. Lindros, K. O. : *Eur. J. Biochem.* **26**, 388 (1972)
14. Lindros, K. O., Vihma, R. and Forsander, O. A. : *Biochem. J.*, **126**, 945 (1972)
15. Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrback, K. : *The enzyme, 3rd ed Vol 8. N. Y. Academic press*, **313** (1973)
16. Sharman, D. F. : *Br. Med. Bull.*, **29**, 110 (1973)