

## 간 조직내의 Retinoic Acid 검출 및 측정 방법

김 초 일

*Alcohol Research and Treatment Center, Bronx Veterans Affairs Medical  
Center, Bronx, and Mount Sinai School of Medicine, New York, New York,  
U.S.A.*

### Detection and Measurement of Retinoic Acid in Human Liver Samples

Kim, Cho-il

*Alcohol Research and Treatment Center, Bronx Veterans Affairs Medical  
Center, Bronx, and Mount Sinai School of Medicine, New York, New York,  
U.S.A.*

#### ABSTRACT

Retinoic acid, the active metabolite of vitamin A, was detected in the human liver for the first time using a new method. A rapid and sensitive technique has been developed using gradient-elution, reverse-phase high performance liquid chromatography. This assay, with simultaneous multiwavelength detection at 294nm, 325nm and 450nm after saponification of liver samples, allows us separation and quantitation of vitamin E, retinoic acid, total retinoids and various carotenoids in one small sample. The proportion of retinoic acid to total retinoids in human liver appears to be quite consistent ( $2.4 \pm 0.2\%$ ). With low vitamin A storage in liver, detection at another wavelength 354nm would increase the sensitivity for retinoic acid of small quantity. This method of analysis could be used for other tissues like red blood cells, plasma or serum, also. Hepatic retinoic acid level with total retinoids and carotenoids would serve a better indicator of functional vitamin A nutriture especially for those with disease requiring needle biopsy of liver.

**KEY WORDS** : retinoic acid · human liver · HPLC.

#### 서 론

비타민 A acid (Retinoic acid)는 흰쥐<sup>1)</sup>나 사람<sup>2)</sup>  
<sup>3)4)</sup>에 있어서 비타민 A의 체내 대사물(endogenous  
metabolites)이다. 1925년 Wolbach와 Howe<sup>5)</sup>가  
상피조직의 분화과정에 있어서 비타민 A의 결정  
적인 역할을 지적한 이래, 세포증식과 분화 등의  
접수일자 : 1991년 5월 2일

근본적인 생체 발달 과정에 대한 비타민 A의 생  
리적, 약학적 역할이 끊임없이 연구되어 왔다<sup>6)</sup>.  
비타민 A의 여러 형태 중 비타민 A(Retinol), 비  
타민 A 에스터(Retiny esters), 비타민 A 알데히드  
(Retinaldehyde)등은 시각과 생식에 영향을 미치  
는 것으로 알려져 있으며<sup>7)</sup>, 특히 비타민 A acid  
(Retinoic acid, RA)는 성장 즉 세포증식과 분화에

활성을 나타내며<sup>8)</sup> 경우에 따라서는 그 전구체인 비타민 A보다 더 강력한 효과를 나타낸다<sup>9)</sup>. 이러한 Retinaldehyde나 RA가 간조직 내에서 비타민 A로 부터 형성되는 과정에는 몇가지 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다. 비타민 A에서 Retinaldehyde가 생성되는 과정에는 오래전부터 알려진 수용성 세포질 효소인 cytosolic retinol dehydrogenase (CRD) 와 최근 Leo등<sup>10)</sup>에 의해 발표된 불용성 microsomal retinol dehydrogenase (MRD)가 관여하며, 이 두 효소의 상대적 중요성은 환경 조건에 따라 달라진다. 예를 들면, 알콜중독의 경우에는 CRD는 그 활성이 억제되나, MRD는 그 활성이 증가되어 비타민 A 대사에 있어서의 상대적 중요성이 커지게 된다<sup>10)</sup>. 그 결과 생성된 Retinaldehyde가 RA로 대사되는 과정에서는 또다른 2 가지의 수용성 세포질 효소, 즉 NAD<sup>+</sup>에 의존하며 cyanide에 반응하지 않는 Retinal dehydrogenase와, 산소를 필요로 하며 Cyanide에 의해 억제되는 Retinal oxidase가 관여한다<sup>11)</sup>. 이 두 효소는 동물의 종류나 장기 조직의 종류에 따라 활성이 다르며, 따라서 비타민 A 대사에 대한 그 기여 정도도 달라진다. 즉, 흰쥐의 간조직의 경우에는 Retinal dehydrogenase가 대부분의 Retinaldehyde를 대사시키지만, deermouse의 간조직에서는 Retinaldehyde 대사의 80% 이상이 Retinal oxidase에 의해 이루어 진다<sup>11)</sup>.

이러한 단계들을 거쳐 여러 조직에서 생성되는 RA는 척추동물에 있어서 morphogen으로서의 중요성이 알려짐에 따라<sup>12)</sup> 그 대사 및 역할에 대한 연구가 급속히 가속되었다. 그 결과 최근 혈액 내에서 RA 및 그 대사물이 검출되었으며<sup>2)3)4)13)</sup>, 또한 사람의 간조직으로부터 분리 정제한 cytochrome P450IIC8이 RA를 극성대사물(polar metabolites)로 전환시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다<sup>14)</sup>. 그러나 아직까지 RA가 체내 어느 조직에서 형성되는 지는 밝혀지지 않았다.

이러한 관점에서 미루어 볼 때 사람의 간조직 내에서 RA 및 RA 대사물의 검출은 더욱 더 필요하게 되었지만 지금까지는 알려진 방법이 없었다. 생물학적 시료에서 비타민 A들의 분석에는,

비타민 A 특유의 불안정성 때문에 신속하고 예민하며 또 여러가지 이성체 및 그 대사물을 넓은 극성 범위에 걸쳐 분리할 수 있는 liquid chromatography와 UV 검출 방법의 조합이 필수적이며<sup>15)</sup>, 따라서 본 연구에서는 High performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 사람 간조직 내의 RA 측정법을 고안하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사람의 간조직 시료

간조직 시료는 어떠한 만성이나 급성 질병과도 관계없이 사고로 사망한 사람들의 장기를 기증받아 연구용으로 보급하는 Organ Donor Bank로부터 확보하였다. 간조직은 기증자 사망 후 30분 이내에 사체로부터 분리하여 액체질소에 급속냉동시켜 -135°C에 저장 한 후, dry ice와 함께 수송하여 본 연구소에서는 -80°C에 보관했다. 간조직 기증자의 성별 및 연령은 Table 1에 나타난 바와 같다.

### 2. 비타민 A acid(Retinoic acid, RA) 추출

간조직 시료로부터 RA 추출은 Shapiro 등<sup>16)</sup>의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 간조직 절편은 그 무게를 냉동상태에서 측정한 뒤 1.15% KCl용액(4°C)에 넣어 해동시킨 후 균질화하였다(10배 희석). 이 homogenate를 300~500  $\mu$ l 취해 그 1/3 부피의 25% sodium ascorbate 용액과 섞어 vortex한 후 homogenate의 4/3 부피의 absolute ethanol을 더하고 다시 vortex시켰다. 이 상태로 70°C 수조에서 5분간 incubate한 뒤, homogenate의 2/3 부피의 10N KOH 용액을 더하고 조심스럽게 vortex했다. 시험관 마개를 약간 느슨하게 막고 다시 70°C의 수조에서 30분간 비누화시켰다. 이때의 모든 조작은 가능한 한 어두운 곳에서 이루어졌고 비누화가 끝난 시료는 찬물에 담가 식힌 후, 3ml의 hexane을 더해 잘 vortex한 후 4°C에서 30분간 방치해 비타민을 추출했다. 이것을 2,000 $\times$ g에서 10분간 원심하여(4°C) dry ice-acetone-chloroform bath에 담가 하층액을 냉동시킨 후, 상층의 hexane을 다른 시험관에 따라 냈다. 이와 같은 추

Table 1. Retinoic acid and total retinoids in human liver samples

Subject	Sex	Age	Retinoic acid (nmol/g)	Total saponified retinoids (nmol/g)	% retinoic acid
A	F	15	11.2	518	2.1
B	M	20	14.5	634	2.2
C	M	14	8.9	396	2.2
D	F	28	12.7	787	1.6
E	M	11	31.2	2,021	1.5
F	F	6	73.6	3,112	2.3
G	M	11	47.1	1,811	2.5
H	F	9	60.2	2,508	2.3
I	F	2	33.9	1,154	2.9
J	F	29	22.0	921	2.3
K	NA*	NA*	16.5	1,382	1.2
L	M	20	7.0	191	3.5
M	M	17	26.9	627	4.1
Mean± SEM					2.4± 0.2

\*not available

출과정을 2번 더 반복하여, 3번의 hexane 추출물을 섞어 질소가스로 휘발시키고, 나머지는 200 $\mu$ l~1 ml의 HPLC용 시료용매에 다시 용해시켰다. HPLC용 시료용매의 조성은 Acetonitrile/Methylene chloride/Methanol=7/2/1 이었다.

### 3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

모든 HPLC 분석은 photo-diode-array detector를 사용해 simultaneous multiwavelength detection이 가능하며 Chemstation과 HP-7470 plotter가 부착되어 있는 Hewlett Packard사 (Avondale, PA, U.S.A.)의 Model HP-1090 liquid chromatograph를 사용하였다. Column은 Zorbax ODS(Octadecylsilane : 0.39 $\times$ 15cm, Mac-Mod Anal. Inc., Chadds Ford, PA, U.S.A.)를 사용하였으며, 2 가지 용매를 사용하여 gradient elution하였다. 용매의 조성은 mobile phase A(MA)가 Acetonitrile/H<sub>2</sub>O/Acetic acid(90/10/0.04)이며, mobile phase B(MB)는 Acetonitrile/Methylene Chloride/Methanol(70/20/10)로 MA와 MB 모두 10 mM의 Ammonium Acetate가 포함되었다. Gradient elution은 처음(t=0)

100% MA로 시작하여 10분 후 (t=10)에 100% MB가 되는 linear gradient에 이어 이후 9분간 (t=19) 100% MB를 유지하고 이후 1분간 (t=20)에 걸쳐 100% MA로 환원하는 방법을 사용하였다. 각 시료당 분석에 소요되는 시간은 이와 같이 20분이며 각 시료분석 이후 4~5분간 MA 100%를 유지해 column의 평형(equilibration)을 기했다. UV에 의한 검출은 294nm, 325nm 및 450nm의 3가지 파장을 동시에 사용하여 각각 비타민 E, 비타민 A 및 카로티노이드계를 동시에 검출, 측정하였다. RA와 비누화된 비타민 A들의 정량은 RA와 비타민 A(Retinol)의 표준용액(in 100% Ethanol)을 주입하여 그 peak의 spectrum과 retention time(RT)을 확인한 후, peak 면적을 비교하여 계산하였다. 전 HPLC 분석과정에서의 유속은 1.5 ml/min을 유지하였고, column oven의 온도는 30 $^{\circ}$ C, HPLC용 시료의 주입량은 시료에 따라 25~150  $\mu$ l였다. 모든 HPLC 용매와 Ammonium Acetate, Acetic Acid 등은 J.T. Baker Chemical Co. (U.S.A.)로 부터 구입하였으며, 용매는 0.5 $\mu$ m fluoropore filter (Milipore, Bedford, MA, U.S.A.)로 여과한 후 사용하였다. 이외의 다른 시약들은 모두 Sigma

Retinoic acid in human liver

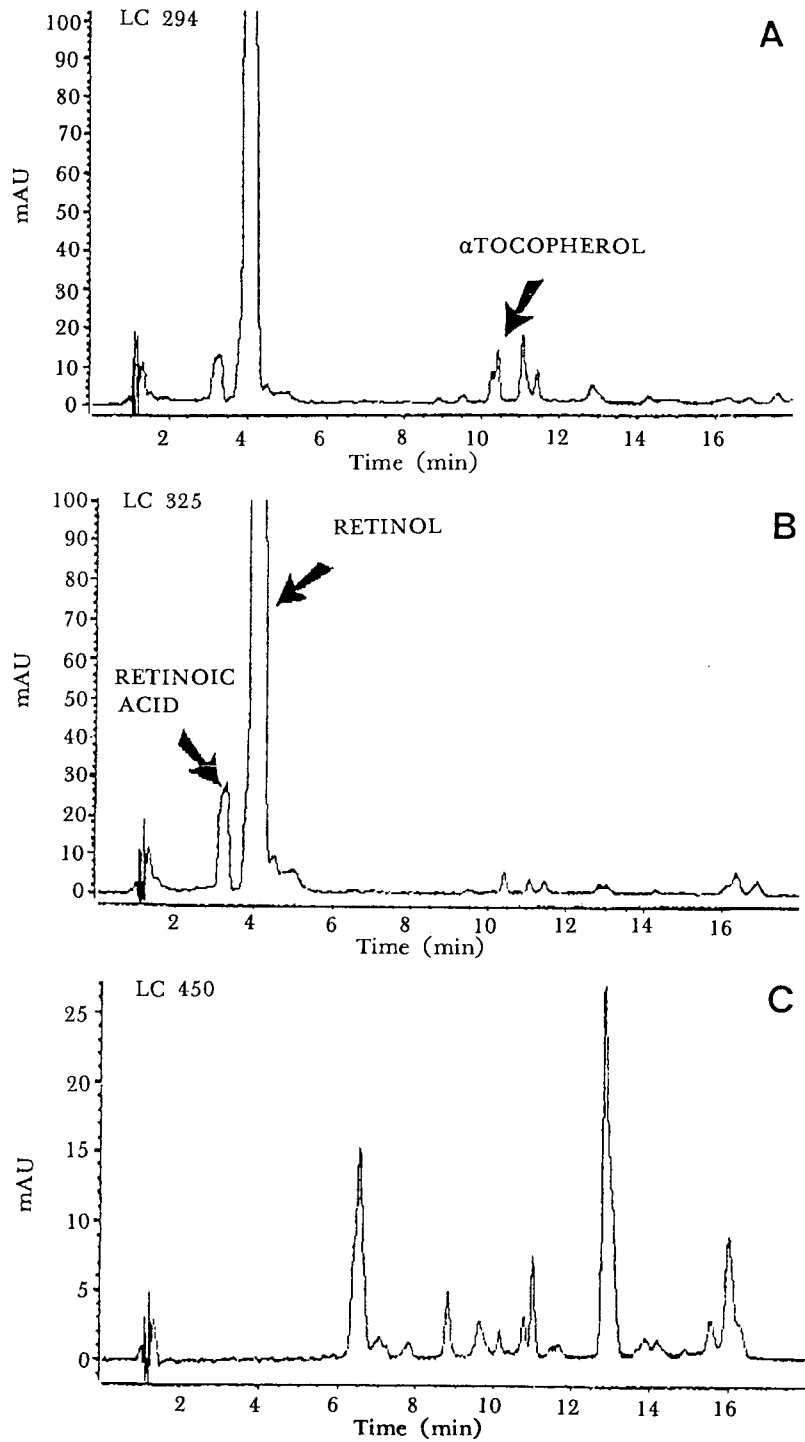


Fig. 1. The representative chromatograms at three different wavelengths for a human liver sample. A : 294 nm for vitamin E. B : 325 nm for RA and retinoids. C : 450 nm for carotenoids.

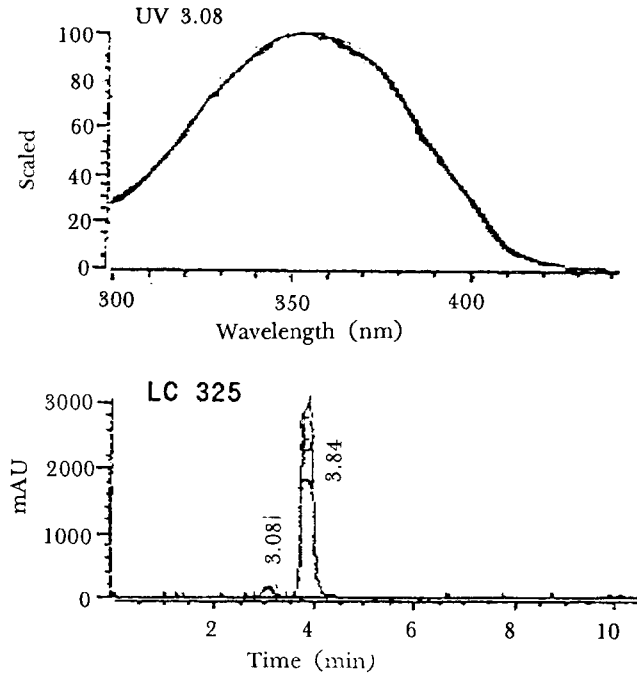


Fig. 2. Chromatogram for retinoids at 325 nm of a human liver sample. The peak at 3.08 min shows an unique and typical spectrum of retinoic acid.

Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

### 결과 및 고찰

3 파장 동시분석 결과, Figure 1에서 보는 바와 같이 각 파장에서의 독특한 chromatogram을 구할 수 있었다. 294nm(Fig. 1-A)에서의 비타민 E( $\alpha$ -tocopherol) peak는 약 10.3min RT, 즉 용매가 100% mobile phase B(MB)로 바뀐 뒤에 나타남으로써, 이 비타민의 지용성을 잘 나타내었다. Figure 1-B의 325nm에서의 측정에서는, 비타민 A 종류들의 각기 다른 극성(polarity)에 따라 RA peak가 약 3.1 min RT에, 비타민 A peak(retinol)가 약 3.8min RT에 나타났다. Figure 1-C의 450nm에서의 측정은 카로티노이드의 검출을 위한 것으로서 Lycopene,  $\alpha$ -carotene 및  $\beta$ -carotene이 약 13min RT, 15.5min RT 및 16min RT에 각각 나타났다. 이상에서 언급된 각 물질의 peak들은 그 표준용액

들을 주입하여 각기 spectrum 및 RT를 비교 확인하였으며, 특히 RA는 Figure 2에 그 전형적이고 독특한 spectrum을 보였다. 이렇게 측정된 사람의 간조직내의 RA 값은 Table 1에서 볼수 있듯이, 총비타민 A(비타민 A+비수화된 비타민 A 에스터+RA)량의 약 2.4%에 해당되었다. 이 비율은 간조직내의 비타민 A 저장량과 관계없이 거의 일정한 듯하며, 따라서 비타민 A의 축적량이 낮은 경우에는 RA 값도 낮아지게 되어, RA 최대 흡광파장이 아닌 325nm에서의 검출이 힘들게 된다. 이러한 경우에는 354nm 파장을 한가지 더 첨가하여 chromatogram을 구하면 RA peak가 커지고, 비타민 A peak는 작아져, 근접한 비타민 A peak에 의한 방해받지않고 RA peak 검출의 예민도를 증가시킬 수 있다.

비타민 A의 역할에 있어서의 RA의 중요성은 오랫동안 거론되어 왔으나, 인체 조직 내에서의 검출은 쉽게 이루어지지 않았다. 최근 혈액에서 비타민 A의 체내 대사물질로서 RA 및 그 이성체가

검출되었으나<sup>2)3)4)13)</sup>, 사람의 간 조직 내에서의 RA의 존재가 보고된 것은 본 연구가 처음이다. 이 RA의 분석방법은 약 30mg정도의 간 조직 시료로부터 RA 및 총비타민 A, 비타민 E, 카로티노이드 등을 정량할 수 있으므로 needle biopsy 시료에도 적용이 가능하다. 혈액내의 비타민 A 값은 최근의 식이 섭취를 반영하는 경향이 있으나 비타민 A의 주된 축적기관<sup>17)</sup>인 간조직의 비타민 A 값은 이 비타민의 체내 저장량을 나타내므로, 비타민 A 영양 상태 판정의 이상적인 지표라할 것이다<sup>18)</sup>. 정상인의 체내 비타민 A 보유량의 90% 이상이 간에 축적되므로<sup>19)</sup>, 간 조직내의 비타민 A 값과 더불어, 그 활성 대사물 RA 값에 대한 정보는 needle biopsy가 필요한 질병 상태에서의 단순한 영양 상태가 아닌 비타민 A의 기능적 영양 상태를 판정할 수 있게 하여 질병의 진단 및 처치에 많은 도움이 되리라고 사료된다.

## 요 약

비타민 A의 활성 대사물인 비타민 A acid(retinoic acid, RA)를 사람의 간 조직내에서 처음으로 검출하고, 측정하는 방법을 고안하였다. Reverse phase HPLC에 gradient elution을 사용하는 이 방법은 Multiwavelength 검출법을 이용하여 RA, 비타민 A, 비타민 E 및 카로티노이드를 모두 약 30mg 정도의 시료로부터 검출할 수 있었다. HPLC 분석에 소요되는 시간은 시료당 20분으로 상당히 신속하며 또 예민하다. 간 조직내의 총비타민 A 량에 대한 RA의 비율은 비타민 A의 축적량에 관계없이 일정한 편으로 약  $2.4 \pm 0.2\%$ 로 타나났다. RA의 간 조직내의 검출은 RA가 비타민 A의 체내 대사산물임을 다시 한번 확인시켰으며, 그 함량에 대한 정보는 총비타민 A량과 함께 비타민 A 영양 상태 판정에 보다 좋은 지표가 될 것이다. 특히 간 조직의 needle biopsy가 필요한 질병 상태의 경우, 비타민 A의 기능적 영양 상태판정을 가능하게 하여 질병의 진단 및 처치에 도움이 되리라고 사료된다.

## Literature cited

- 1) Cullum ME, Zile MH. Metabolism of all-trans-retinoic acid and all-trans-retinyl acetate. *J Biol Chem* 260 : 10590-10596, 1985
- 2) De Ruyter MG, Lambert WE, De Leenheer AP. Retinoic acid : An endogenous compound of human blood. Unequivocal demonstration of endogenous retinoic acid in normal physiological conditions. *Anal Biochem* 98 : 402-409, 1979
- 3) De Leenheer AP, Lambert WE, Claeys I. All-trans-retinoic acid : Measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 23 : 1362-1367, 1982
- 4) Tang G, Russell RM. 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipid Res* 31 : 175-182, 1990
- 5) Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J Exp Med* 42 : 753-777, 1925
- 6) Halgunset J, Sunde A, Lundmo PI. retinoic acid (RA) : An inhibitor of 5 $\alpha$ -reductase in human prostatic cancer cells. *J Steroid Biochem* 28 : 731-736, 1987
- 7) Ribaya-Mercado JD, Kassarijan Z, Russell RM. Quantitation of the enterohepatic circulation of retinol in the rat. *J Nutr* 118 : 33-38, 1988
- 8) Dowling JE, Wald G. The biological function of vitamin A acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 46 : 587-608, 1960
- 9) Anonymous. retinoic acid biosynthesis from retinol. *Nutr Rev* 46 : 30-31, 1988
- 10) Leo MA, Kim C, Lieber CS. NAD<sup>+</sup>-dependent retinol dehydrogenase in liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 259 : 241-249, 1987
- 11) Leo MA, Kim C, Lowe N, Lieber CS. Increased hepatic retinal dehydrogenase activity after phenobarbital and ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 38 : 97-103, 1989
- 12) Gudas LJ. Molecular mechanisms of retinoic action. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2 : 319-320, 1990
- 13) Chiang T. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for low levels of retinoic acid in human blood. *J Chromatogr* 182 : 335-340, 1980
- 14) Leo MA, Lasker JM, Raucy JL, Kim C, Black M,

- Lieber CS. Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch Biochem Biophys* 269 : 305-312, 1989
- 15) Wyss R, Bucheli F. Ultra-sensitive coupled-column liquid chromatographic determination of retinoic acids by direct injection of large plasma volumes and ultraviolet detection. *J Pharmaceut Biomed Anal* 8 : 1033-1037, 1990
- 16) Shapiro SS, Mott DJ, Machlin LJ. Kinetic characteristics of  $\beta$ -carotene uptake and depletion in rat tissue. *J Nutr* 114 : 1924-1933, 1984
- 17) Blomhoff R. Hepatic retinol metabolism : Role of the various cell types. *Nutr Rev* 45 : 257-263, 1987
- 18) Amedee-Manesme O, Furr HC, Olson JA. The correlation between liver vitamin A concentrations in micro-(needle biopsy) and macrosamples of human liver specimens obtained at autopsy. *Am J Clin Nutr* 39 : 315-319, 1984
- 19) Olson JA. Evaluation of vitamin A status in children. *World Rev Nutr Diet* 31 : 130-134, 1978