

메틸기 결핍이 Diethylnitrosamine과 2-Acetylaminofluorene을 투여한 쥐 간의 지질과산화도에 미치는 영향*

김현아 · 최혜미 · 조은영 · 김경민 · 김현덕* · 변기원 · 윤은영**

서울대학교 가정대학 식품영양학과

기전여자전문대학 식품영양과*

대전대학교 이과대학 식품영양학과**

Effects of Methyl Group Deficiency on Hepatic Lipid Peroxidation in Diethylnitrosamine and 2-Acetylaminofluorene Treated Rats

Kim, Hyun-A · Choi, Haymie · Cho, Eun Young · Kim, Kyungmin
Kim, Hyun Duck* · Byun, Ki Won · Yoon, Eun Young**

Department of Food and Nutrition, College of Home Economics, Seoul National University

**Department of Food and Nutrition, Kijeon Women's College*

***Department of Food and Nutrition, College of Science, Taejon University*

ABSTRACT

This study determined hepatic microsomal lipid peroxide values, glucose 6-phosphatase, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytosolic glutathione S-transferase activities to examine the effects of methyl group deficiency on hepatic lipid peroxidation in rats treated with diethylnitrosamine(DEN) and 2-acetylaminofluorene(AAF).

Weanling Sprague Dawley male rats were fed the diet with methyl group supplemented or deficient. Two weeks after feeding, rats were injected with a single dose of 200mg/kg body weight DEN intraperitoneally, and after four weeks, 0.02% AAF containing diets were fed for two weeks. Animals were sacrificed at 6th week.

Microsomal lipid peroxide values were tended to increase in methyl group deficiency(MD). Especially, in case of carcinogen treatments, lipid peroxide values were increased significantly in MD. Microsomal glucose 6-phosphatase activities were decreased by MD and carcinogens, and in MD with carcinogen group(MD+C), the enzyme activities were the lowest. Glucose 6-phosphatase activities were negatively correlated with lipid peroxidation. Microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase activities were the highest in MD+C, and correlated positively

*본 연구는 1990년도 한국과학재단 목적기초 연구비로 이루어짐.

채택일자 : 1991년 11월 6일

with lipid peroxidation. Cytosolic glutathione S-transferase activities were the highest in MD+C.

Methyl group deficiency induces lipid peroxidation, especially in case of being exposed to carcinogens. Therefore, the results suggest that lipid peroxidation may be one of the mechanisms of carcinogenesis by methyl group deficiency.

KEY WORDS : methyl group deficiency · carcinogenesis · lipid peroxidation · glucose 6-phosphatase · NADPH-cytochrome P450 reductase · glutathione S-transferase.

서 론

콜린(choline)과 메티오닌(methionine)은 동물체에서 중요한 영양소로서 생체내에서 메틸기 공여체(methyl group donor)로 작용한다¹⁾. 생체내에서 콜린은 생체막의 인지질인 phosphatidylcholine과 sphingomyelin의 구성성분이고, 메틸기의 급원으로 생체내 여러 고분자의 메틸화반응에 관여하며, 지방산을 방지하고 신경전달 물질인 아세틸콜린(acetylcholine)의 전구체이다²⁾.

메틸기 결핍식은 콜린과 메티오닌을 결핍시키거나, 콜린, 메티오닌, 엽산(folic acid) 등을 결핍시키는 것으로, 이러한 식이를 장기간 섭취하거나, 단백질 결핍 또는 알콜중독이 장기간 지속됨으로써 메틸기 결핍이 초래 되는 경우, 신장기능 저하, 지방간 등을 발생시키며, 발암원에 대한 민감성도 증대되는 것으로 알려져 있다³⁾⁴⁾. 메틸기결핍이 발암원에 대한 민감성에 미치는 영향에 대한 연구는 기관에 따라 그 결과가 다르게 나타나나, 간의 경우 메틸기결핍이 발암원에 의한 암의 발생을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다²⁾⁵⁾⁶⁾.

메틸기결핍이 발암원에 의한 암발생을 촉진시키는 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 그 가능한 기전중 하나로 막의 인지질 대사 변화로 인한 지질과산화도에 대한 연구가 진행되고 있다⁷⁾⁸⁾⁹⁾. 생체막의 불포화 지방산의 과산화반응에 의해 생성되는 자유라디칼, 지질과산화물, 카보닐화합물 등은 막의 구조와 세포의 소기관에 영향을 줄 수 있고, 지질과산화 산물인 malondialdehyde(MDA)는 아미노산이나 단백질과 같은 아민화합물, 인지질의 head group, DNA, RNA 등과 결합한다고 한다¹⁰⁾. 따라서 지질과산화 반응은 막의 손상과 더불어 DNA에 유전적인 변화를 유발할 가능성이 있고,

이것이 암의 촉진단계와 관련이 있다고 알려져있다¹¹⁾.

따라서 본 연구에서는 메틸기 결핍이 발암원으로 diethylnitrosamine(DEN)과 2-acetylaminofluorene(AAF)을 투여한 쥐간의 지질과산화도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, microsome의 지질과산화물 생성정도를 측정하고 더불어 막 손상의 지표가 되는 glucose 6-phosphatase(G6Pase), 약물 대사의 phase 1 효소로 자유라디칼을 생성하는 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성도 및 약물대사의 phase 2 효소로 지질과산화물의 제거에 관여하는 cytosol의 glutathione S-transferase(GST) 활성도를 측정 하고자 한다.

실험재료 및 방법

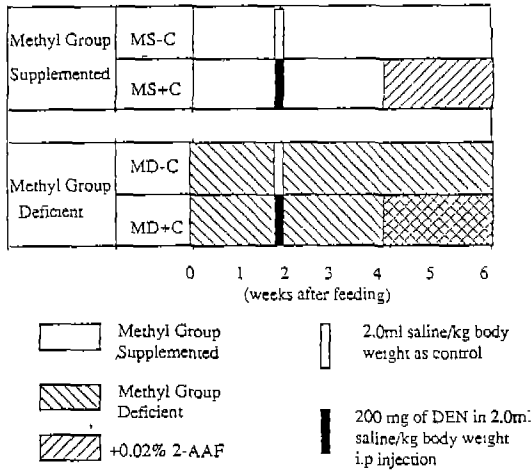
1. 실험 동물의 사육

이유된 Sprague-Dawley종 수컷 50~60g된 것을 서울대학교 실험동물 사육장으로 부터 공급받아 실험식이에 따라 각군당 체중을 고려하여 나누어 사육하였다. 이때 온도, 습도 및 채광은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 1\%$, 7:00~19:00으로 조절하였으며, 사료와 물은 임의로 섭취하도록 하였다.

2. 실험식이 및 처치

식이의 종류에 따라 메틸기 보충군과 메틸기 결핍군으로 나누어 6주간 사육하였다. 실험시작 2주후, 각 식이군을 대조군과 약물 투여군으로 나누어 약물 투여군에는 DEN을 생리 식염수에 녹여 체중 kg당 200mg씩 1회 복강주사하고 대조군에는 생리 식염수를 투여하였다. DEN투여 2주후 부터 2주동안 약물 투여군에 2-AAF를 식이지방에 녹여 식이무게당 0.02%수준으로 섭취시킨후 전 동물을

메틸기 결핍이 간 지질과산화도에 미치는 영향



MS-C : methyl supplemented without carcinogens
 MS+C : methyl supplemented with carcinogens
 MD-C : methyl deficient without carcinogens
 MD+C : methyl deficient with carcinogens

Fig. 1. Experimental design.

희생시켰다.

메틸기 보충군은, 콜린을 포함하지 않은 비타민 혼합제를 사용한 메틸기 결핍군에 비해 0.075%의 콜린을 포함한 비타민 혼합제를 사용하였으며 식이 100g당 콜린 클로라이드(choline chloride) 0.2g, DL-메티오닌 0.3g, 엽산 0.1mg을 각각 더 첨가하였다.

실험설계는 그림 1에, 식이조성은 표 1에 각각 나타내었다.

3. 시료의 수집

실험시작 6주후에 12시간 금식시킨 후 동물을 희생시키고 간을 절제하여 냉각한 식염수로 씻은 후 여과지에 놓아 여분의 물을 흡수 시키고, 액체 질소로 급냉시켜 -60°C에서 보관하였다가 실험에 사용 하였다.

Homoginizer를 사용하여 tris-HCl buffer (pH 7.4)로 간을 균질화 시킨 후, 4°C, 12,000xg에서 20분간 원심분리하였다. 이때 얻어진 상층액을 다시 4°C, 105,000xg에서 1시간 원심분리하여 상층액은 cytosol분획으로 하였고, microsome분획은 tris-HCl buffer(pH 7.4)로 재부유시켜 에펜도르프튜브에 일정 량씩 나누어 액체질소로 급냉 시킨 후, -60°C에서 보관 하였다가 분석에 사용하였다.

Table 1. Composition of experimental diet (g/100g diet)

	Methyl Group Supplemented	Methyl Group Deficient
Corn starch	54.5	55.0
Casein	20.0	20.0
Cellulose	5.0	5.0
Soybean oil	15.0	15.0
Vit. Mix. w/ choline (1)	1.0	—
Vit. Mix. w/o choline (2)	—	1.0
Salt Mix.(3)	4.0	4.0
DL-methionine	0.3	—
Choline chloride	0.2	—
Folic acid	0.1(mg)	—

1) Nutritional Biochemicals. ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio. Vitamin mixture is composed of : Vit. A Acetate(500,000 IU per g) 0.125, α -Tocopherol (250 IU per g) 22.0g, Ascorbic acid 45.0g, Inositol 5.0g, Choline Chloride 75.0g, Menadione 2.25g, p-Aminobenzoic acid 5.0g, Niacin 4.25g, Riboflavin 1.0g, Pyridoxine hydrochloride 1.0g, Calcium Pantothenate 3.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.09g, Vitamin B₁₂ 0.00135g and Dextrose to 1kg

2) ICN vitamin mixture without choline chloride

3) Composition of salt mixture, g/kg mixture : CaHPO₄ 500g, NaCl 74g, K₂SO₄ 52g, Potassium Citrate Monohydrate 220g, MgO 24g, Manganous Carbonate(43-48% Mn) 3.5g, Ferric Citrate(16-17% Fe) 6.0g, Zinc Carbonate 1.6g, Cupric Carbonate(53-55% Cu) 0.3g, KIO₃ 0.01g, Chromium Potassium Sulfate 0.55g, Na₂SeO₃ 5H₂O 0.01g, Sucrose finely powered 118.0g

4. 생화학적 분석

Microsome의 지질과산화물의 함량은 TBA법¹²⁾에 의해 분석하였고 microsome의 glucose 6-phosphatase(G6Pase)의 활성도는 Baginski의 방법¹³⁾에 의해 분석하였다.

Microsome의 NADPH-cytochrome P450 reductase의 활성도는 Master 등의 방법¹⁴⁾에 의해 분석하였으며, cytosol의 glutathione S-transferase(GST)의 활성도는 Habig 등의 방법¹⁵⁾을 이용하여 분석하였다.

5. 통계처리

실험결과는 SAS를 이용하여, $\alpha=0.05$ 수준에서 ANOVA test후, Duncan's multiple range test에 의

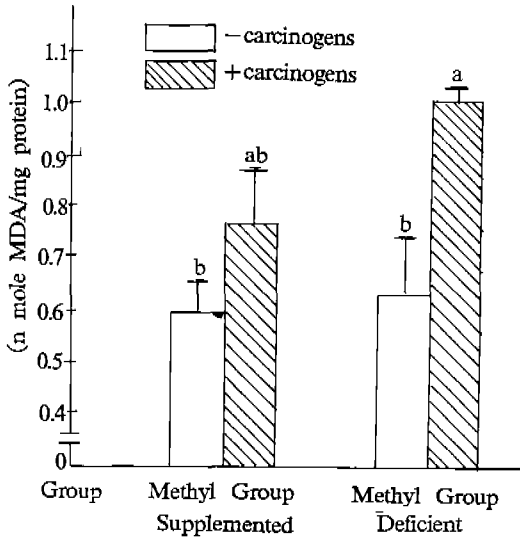


Fig. 2. Effects on methyl group deficiency on the hepatic microsomal lipid peroxide values in carcinogen treated rats.
 Mean ± SE
 Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test.
 Average number of samples analyzed in replicates is 4.

하여 각 실험군간의 유의차를 검증하였다.

실험결과 및 고찰

메틸기 결핍식은 간세포에 구조적, 기능적 이상을 초래하는데, 막 인지질의 변화가 그 원인으로 생각되고 있다¹⁶⁾. 본 실험결과 메틸기 결핍식에 의한 실험동물의 체중감소는 없었고 AAF를 첨가한 식이를 섭취한 군에서는 대조군에 비해 약간의 체중감소를 보였다. 각군별 지질과산화 정도는 그림 2에 나타내었다. 메틸기 결핍이 지질과산화 정도에 미치는 영향을 보면, 발암원에 노출되지 않는 경우 메틸기 결핍군(MD-C)이 메틸기 보충군(MS-C)에 비해 지질과산화 정도가 다소 증가하는 경향을 보이거나 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 발암원에 노출된 경우에도 같은 경향을 보였다. 그러나, 발암원에 노출된 경우(MS+C와 MD+C), 노출되지 않은 경우(MS-C와 MD-C)보다 메틸기 결핍에 의한

지질과산화 증가 경향이 더 큰것으로 나타났다. 외부에서 투여된 발암원이 지질과산화 정도에 미치는 영향을 보면, 메틸기를 보충해 준 경우, 발암원 투여군(MS+C)이 대조군(MS-C)에 비해 증가하는 경향을 보이거나 유의적인 차이가 없었다. 그러나, 메틸기가 결핍된 경우에는 발암원 투여군(MD+C)이 대조군(MD-C)에 비해 지질과산화 정도가 유의적으로 증가하였다. 이것은 짧은 기간동안의 메틸기 결핍도 외부로부터의 발암원에 노출된 경우 지질과산화 정도를 증가시킨다는 것을 시사하며, 서론에서 보았듯이 지질과산화가 암화과정의 한 기전으로 작용한다고 생각할 때¹¹⁾, 메틸기 결핍에 의한 암 발생 촉진의 기전중 하나로 지질과산화의 증가를 들 수 있다고 본다. 메틸기 결핍에 의한 지질과산화의 증가는 막 인지질 대사의 변화때문으로 사료된다¹¹⁾¹⁶⁾.

Glucose 6-phosphatase(G6Pase)는 간과 신장의 소포체에 주로 분포하며, 탄수화물의 대사에 관계하는 효소로, 과산화반응 등에 의해 간세포가 손상되거나 암화과정의 진행시, 또는 종양의 생성시 급격히 활성도가 감소한다고 알려져 있다¹⁵⁾¹⁶⁾. 쥐 간을 *in vitro*에서 과산화 시킬때, 막 부착효소인 G6Pase의 활성도가 감소하며 그 정도는 지질과산화 정도와 음의 상관관계를 갖는다고 보고되었는데, 이는 지질과산화로 인한 생체막의 손상이 그 원인이라 한다¹⁷⁾. 각 군별 G6Pase 활성도는 그림 3에 나타내었다. 메틸기 결핍이 G6Pase 활성도에 미치는 영향을 보면, 발암원에 노출되지 않은 경우(MS-C와 MD-C), 메틸기 결핍에 의해 활성도가 유의적으로 감소하였고, 발암원에 노출된 경우(MS+C와 MD+C)에도 유의적이지는 않으나 메틸기 결핍에 의해 효소 활성도가 감소하는 경향을 보였다. 외부에서 투여된 발암원이 G6Pase 활성도에 미치는 영향을 보면 메틸기 보충시(MS-C와 MS+C)나 메틸기 결핍시(MD-C와 MD+C)모두 발암원에 의해 유의적으로 감소하여 발암원의 투여로 인한 생체막의 손상 또는 암화의 초기단계의 진행 등을 생각할 수 있다. 본 실험에서도 Wills 등의 보고¹⁷⁾에서와 같이 지질과산화 정도와 G6Pase 활성도 간에는 음의 상관관계를 보였다.

메틸기 결핍이 간 지질과산화도에 미치는 영향

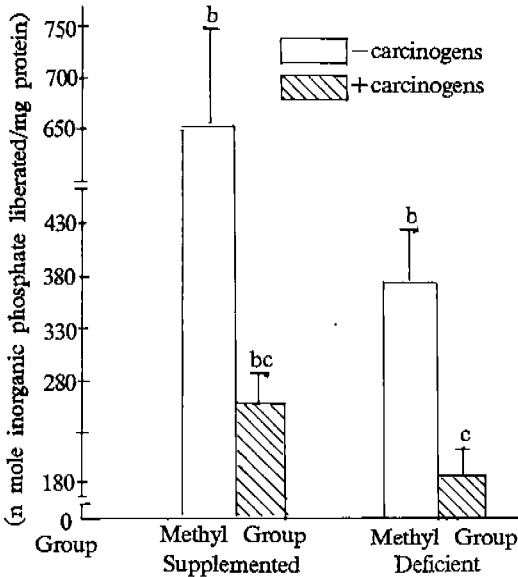


Fig. 3. Effects of methyl group deficiency on the hepatic microsomal glucose 6-phosphatase activities in carcinogen treated rats. Mean ± SE

NADPH-cytochrome P450 reductase는 flavoprotein으로 FAD와 FMN을 각각 한 분자씩 가지며 전자를 NADPH에서 terminal oxidase인 cytochrome P450으로 전달하는 촉매역할을 하는 효소로 이 효소에서 cytochrome P-450으로 전자가 전달되는 과정에서 지질과산화가 발생할 수 있다¹⁸). NADPH-cytochrome P450 reductase 활성도는 발암원에 노출된 경우 메틸기 결핍시(MD+C), 메틸기 보충시(MS+C)에 비해 유의적으로 증가 하였으며, 전체적인 경향은 지질과산화 정도와 비슷한 경향으로 양의 상관관계를 보였다(그림 4). Campbell 등의 연구¹⁹)에 의하면, NADPH-cytochrome P450 reductase를 비롯한 mixed function oxidase계 효소들은 콜린의 결핍시 활성도가 감소한다고 보고 하였으나 본 연구의 결과는 이와 반대되는 경향을 보였는데 이에 대한 연구는 더 진행되어야 한다고 본다.

Glutathione S-transferase(GST)는 소수성, 친전자성 물질은 환원형의 glutathione과 반응을 촉매하는 효소로 해독화에 주요한 역할을 수행한다²⁰). 발암원에 노출되지 않은 경우(MS-C와 MD-C) GST활

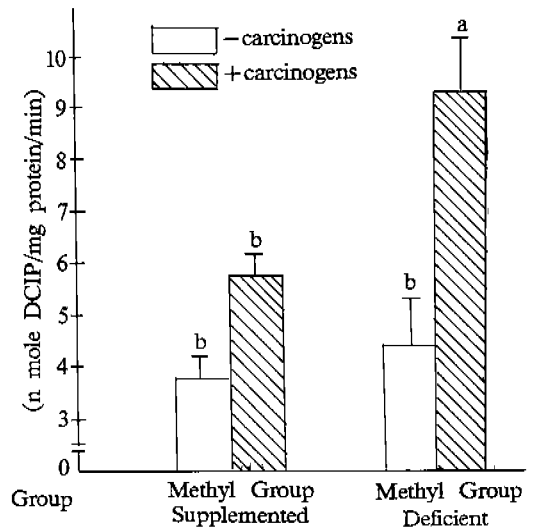


Fig. 4. Effects of methyl group deficiency on the hepatic microsomal NADPH-cytochrome P450 activities in carcinogen treated rats. Mean ± SE

성도는 메틸기 결핍에 의해 감소하는 경향을 보였다(그림 5). 이는 메틸기 결핍시 GST 활성도가 메틸기 보충시 보다 감소한다는 Murray 등의 보고²¹)와 일치하나 본 실험실에서 이미 행해진 연구¹)에서는 이와 반대되는 경향을 보였다. 발암원에 노출시에는 메틸기 결핍에 의해 효소 활성이 증가하여, 본 실험실에서 이미 행해진 연구결과¹)와 일치하였다. GST는 지질과산화물 이나 발암원의 대사물을 대사시키는 등 생체 방어적인 역할을 수행하나 일반적으로 암화과정 동안 GST isozyme들의 활성도가 증가하기 때문에²²)²³) 단순히 GST 활성도만으로 세포내 지질과산화물이나 발암원 대사물의 양에 대하여 논하기는 어려우며, 이것은 반드시 지질과산화물이나 발암원대사물의 생성정도와 관련지어 생각해야 할 것이다.

요약 및 결론

본 연구에서는 메틸기 결핍이 발암원으로 DEN과 2-AAF를 투여한 쥐간의 지질과산화도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, microsome의 지질과산화물의 생성정도를 측정하고 더불어 막의 손상정도의

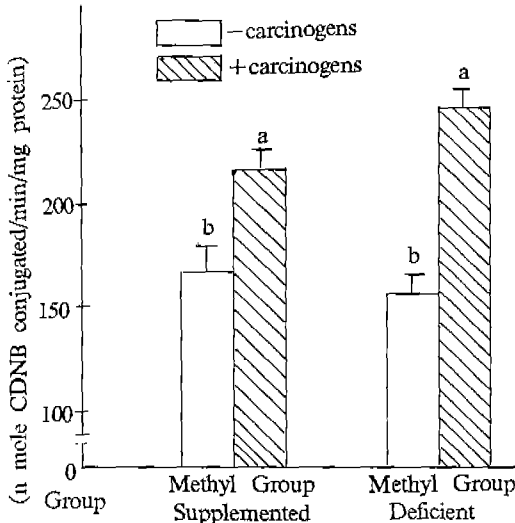


Fig. 5. Effects of methyl group deficiency on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activities in carcinogen treated rats.
Mean ± SE

지표가 되는 G6Pase, 약물대사의 phase 1 효소로 지질과산화물 야기할 수 있는 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성도 및 약물대사의 phase 2 효소로서 지질과산화물 및 발암원의 대사물의 제거에 관여하는 cytosol의 GST 활성도를 측정 하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 메틸기 결핍시, 세포내 microsome의 지질과산화 정도가 증가하는 경향을 보이며, 특히, 메틸기 결핍시 발암원에 노출되면 지질과산화 정도는 유의적으로 증가하였다.

2) Microsome의 G6Pase 활성도는 메틸기 결핍과 약물의 투여에 의해 감소하였으며, 각 군에서 발암원에 노출되면서 메틸기가 결핍된 경우 활성도가 가장 작았다. G6Pase 활성도와 지질과산화 정도는 음의 상관관계를 보였다.

3) Microsome의 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성도는 발암원에 노출되면서 메틸기가 결핍된 경우 가장 높았고 지질과산화 정도와는 양의 상관관계를 보였다.

4) Cytosol의 GST 활성도는 발암원에 노출되면서 메틸기가 결핍된 경우 가장 높았다.

이상의 결과는 메틸기 결핍이 지질과산화물 유

발하며 특히, 발암원에 노출된 경우 더 심각한 결과를 초래할 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 지질과산화가 암화과정의 한 기전이라고 볼 때, 메틸기 결핍에 의한 암화과정의 진행시 지질과산화가 하나의 원인이 될 수 있다고 사료된다.

Literature cited

- 1) Kim HA, Choi HM. Effects of 2-acetylaminofluorene and choline deficiency on lipid peroxidation, glucose 6-phosphatase and glutathione S-transferase activities in rats fed different dietary fats. *Kor J Nutr* 23 : 418-426, 1990
- 2) Shinozuka H, Katyal SL, Perera MIR. Fats, lipotropes, hypolipidemic agents and liver cancer. In : Clement IP, Birt DF, Roger AF, Mettlin C, eds. *Dietary Fat and Cancer*. Alan, R. Liss, Inc, New York 461-486, 1986
- 3) Zeisel SH, Zola T, DaCosta KA, Pomfret EA. Effects of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentration in rat liver. *Biochem J* 249 : 725-729, 1989
- 4) Sawada N, Poirier L, Moran S, Xn YH, Pital HC. The effects of choline and methionine deficiencies on the number and volume percentage of altered hepatic foci in the presence or absence of diethylnitrosamine in rat liver. *Carcinogenesis* 44 : 177-180, 1990
- 5) Hoover KL, Lynch PH, Poirier LA. Profound post-initiation enhancement by short-term severe methionine, choline, vitamin B12 and folate deficiency of hepatocarcinogenesis in F344 rats given a single low-dose diethylnitrosamine injection. *J Natl Cancer Inst* 73 : 1327-1336, 1984
- 6) Rogers AE, Newberne PM. Lipotrope deficiency in experimental carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2 : 104-112, 1986
- 7) Perera MR, Demetris AJ, Katyal SL, Shinozuka H. Lipid peroxidation of liver membrane induced by choline deficient diet and its relation to the diet-induced promotion of γ -glutamyltranspeptidase-positive foci. *Cancer Res* 45 : 2533-2538, 1985
- 8) Berge PK, Aarsasther N, Aarsland A, Svardal A,

메틸기 결핍이 간 지질과산화도에 미치는 영향

- Ueland PM. Effect of choline deficiency and methotrexate administration on peroxisomal β -oxidation, palmitoyl Co-A hydrase activity and the glutathione content in rat liver. *Carcinogenesis* 9 : 619-624, 1988
- 9) Rushmore TH, Ghazardian DM, Subarhmanyam V, Farber E, Ghoshal AK. Probable free radical on the rat liver nuclei during early hepatocarcinogenesis with choline devoid methionine low diet. *Cancer Res* 47 : 6731-6740, 1987
 - 10) Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32 : 1870-1874, 1973
 - 11) Voca CE, Harms-Ringdahal M. Nuclear membrane peroxidation products bind to nuclear macromolecule. *Arch Biochem Biophys* 269 : 548-554, 1989
 - 12) Bidlack WT, Tappel AL. Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* 8 : 177-182, 1973
 - 13) Baginsk ES, Foa PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. *Methd Enz Anal* 2 : 876-880, 1974
 - 14) Masters BSS, Williams CG, Kamin H. The preparation and properties of TPHN-cytochrome C reductase from pig liver. *Methd Enzymol* 10 : 551-573, 1967
 - 15) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249 : 1730-1739, 1974
 - 16) Flask B, Basley W. Acute and persistent ultrastructural changes in rat liver after a single dose of 2-acetylaminofluorene : Effect of co-administration of cycloheximide. *J Pathol* 3 : 1-16, 1980
 - 17) Wills ED. Effect of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of endoplasmic reticulum. *Biochem J* 123 : 983-991, 1971
 - 18) Hodgson E, Guthrie FE eds. Introduction to biochemical toxicology. Elsevier New York pp67-76, 1982
 - 19) Campbell TC, Hayes JR, Newberne PM. Dietary lipotropes, hepatic microsomal mixed-function oxidase activities, and in vivo covalent binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Res* 38 : 4569-4573
 - 20) Schramm H, Roberrson LW, Oesch F. Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 34 : 3735-3739, 1985
 - 21) Murray M, Cantrill E. Sex and substrate dependent changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase enzymes produced by dietary choline deficiency. *Carcinogenesis* 9 : 451-465, 1988
 - 22) Sato K, Kitahara A, Satoh K, Ishikawa T, Tatematsu M, Ito N. The placental form of glutathione S-transferase is a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann* 75 : 199-202, 1984
 - 23) Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H, Ito N. Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 44 : 2698-2703