

¹⁴C-warfarin의 분포 및 쿠마린 유도체류에 의하여 간에서 유도된 동위효소의 정제

박성우[†] · 김은호 · 민지숙 · 유재훈 · 이희성* · 서배석** · 한완수***

국립과학수사연구소 화학분석과

*중앙 대학교 의과대학 생화학교실

**카톨릭의과대학 화학과

***목원대학 화학과

(1992. 3. 11 접수)

The distribution of ¹⁴C-warfarin and the purification of hepatic microsome induced isozymes with coumarin

Sung-Woo Park[†], Eun-Ho Kim, Ji-Sook Min, Jae-Hoon You,

*Hee-Sung Lee, **Bae-Seck Seo, ***Wan-Soo Han

Chemical Analysis Div., the National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-094. Korea.

*Department of Biochemistry, Chung-Ang University.

**Department of Chemistry, Catholic University Medical College.

***Department of Chemistry, Mok-Won College.

(Received March 9, 1992)

요 약. ¹⁴C-warfarin을 흰쥐에 경구투여 후 4시간 경과시 혈액에서 최고치를 나타내었으며, coumarin과 그 유도체인 warfarin에 의한 간조직 microsome 내의 Cyt. p-450은 이들 화합물에 의해 microsomal electron transport system이 증가됨과 Cyt. p-450의 isozyme들이 유도됨을 확인할 수 있었다.

ABSTRACT. The ¹⁴C-warfarin used as rodenticids was identified from various organs of sprague dawley with scintillation counter. And the cytochrome p-450 which was induced by coumarin derivatives was identified with electrophoresis.

The distributions of ¹⁴C-warfarin after 14.8 μ Ci/kg oral application at each organ was as follows: urine-7.5%, blood-0.44%, feces-0.9%, liver-0.66%, lung-0.86%, kidney-0.8%, heart-0.43% and spleen-0.33% after 24 hrs.

The cytochrome p-450 was purified by Octyl Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography and isozymes were 50.8 Kd in control group, 51.3 Kd and 55.2 Kd in coumarin pretreated group and 50.8 Kd, 54.6 Kd and 57.7 Kd in warfarin pretreated group.

Key Words: ¹⁴C-warfarin, cytochrome p-450, hepatic microsome.

1. 서 론

자연계에 널리 존재하는 coumarin은 10년 전에

tonka bean에서 처음 분리한 이래로 식품, 담배 및 화장품공업에서 가향료로 널리 이용되고 있다^{1,2}. 그러나

이 화합물이 coumarin type anticoagulant의 parent 화합물로 이용되면서 많은 유도체가 개발되었고 warfarin을 비롯하여 brodifacoum, bromadiolon, coumatetralyl 등이 살서제로 이용됨으로써 오용 및 자·타살 등의 사회적 사건 발생은 법화학적 분야에서 중요한 문제로 강조되고 있다^{2,3}.

생체내에서 이들 화합물이 간독성은⁴ 물론 tumorigenic activity⁵나 carcinogenicity^{6,7}가 있는 것으로 보고되고 있으나 아직까지 분명히 규명되지 않고 있다. 다른 이물질이나 독성 물질과 같이 coumarin 유도체들도 간 microsome의 cytochrome p-450 산화효소에 의해 주로 대사되어, 보다 polar한 화합물로 hydroxylation되므로 인해 detoxication 혹은 intoxication된다^{8,9}. 이와 같은 대사과정 중에서 대부분 기본 backbone을 유지하면서 biotransformation되어 생체의 각 조직에 분포 혹은 배설된다.

이와 같이 coumarin 유도체류에 의한 cytochrome p-450의 변화량을 Feur^{10,11}는 4-methylcoumarin과 몇몇 그 유도체들에 대하여 실험한 결과, 유도효과가 나타났음을 보고한 바 있으며 또한 Netter¹² 등은 sodium warfarin의 투여로 cytochrome p-450의 양이 증가되었으며 56.4kd의 protein band가 새로 나타남을 보고한 바 있다. 그러나 coumarin 및 유도체류인 warfarin과 bromadiolon이 cytochrome p-450에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 아직 보고된 바 없다.

저자들은 ¹⁴C로 표시된 warfarin을 사용하여 흰쥐에 투여한 후 시간변화에 따른 체내 추적, 각 장기조직별 분포 및 배설 등을 관찰하고, 또한 이들의 대사에 중요한 역할을 하는 간 microsome의 cytochrome p-450의 정제 및 electrophotogram의 pattern 변화를 관찰하여 중독군과 비교군을 비교 판단할 수 있는 실험을 행하였다.

2. 실험

2.1. ¹⁴C-warfarin의 시간변화에 따른 분포

2.1.1. 시약 및 장치

Radioactivity 측정에 사용된 ¹⁴C-warfarin(46mCi /m mole)은 Amersham International plc, methanol, toluene 등은 Fruka, triton X-100, 2,5-diphenyloxazole(ppo) 및 1,4-bis-(5-phenyl-2-oxazol) benzene (popop) 등은 Sigma사 제품을 사용하였고, 그의 시약들은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

2.1.2. 투여 및 실험방법

¹⁴C-warfarin(14.8mCi/kg body weight)를 1m의 corn oil에 suspension한 후 24마리의 흰쥐(sprague dawley 200g 내외)에 투여한 다음 1, 4, 12, 24 시간 후에 처사시켜 혈액, 위내용물, 위조직, 간, 폐, 심장, 비장 등을 적출하였으며, 또한 처사하기 전까지의 요와 변을 수집하여 시료로 사용하였다.

수집된 각 조직들을 3배 용량의 methanol과 혼합하여 균질화시킨 후 vortexing을 사용 2회 추출하여 5~10분 동안 원심분리(2,000~3,000 rpm)시킨 상등액을 50℃, N₂ 기류하에서 건조시킨 다음 toluene-triton X-100 based cocktail 용액을 사용하여 Liquid Scintillation Counter로 radioactivity를 측정하였다. 또한 요는 40℃에서 감압건고하였고, 변과 위내용물은 그대로 3배 용량의 methanol로 2회 추출하여 원심분리(2,000~3,000 rpm)하여 사용하였으며, 혈액은 H₂O₂로 hemoglobin을 분해하여 color quenching을 방지한 후 그대로 사용하여 radioactivity를 측정하였다.

2.1.3. ¹⁴C-warfarin의 회수율 및 radioactivity 측정

각 시료들로부터 추출된 ¹⁴C-warfarin과 함께 유리된 색소 및 수분을 고려하여 cocktail solution 2종류, 즉 Brays solution(ppo 4g, popop 0.2g, naphthalene 60g, ethylene glyco 120ml, methanol 100ml, dioxane 888

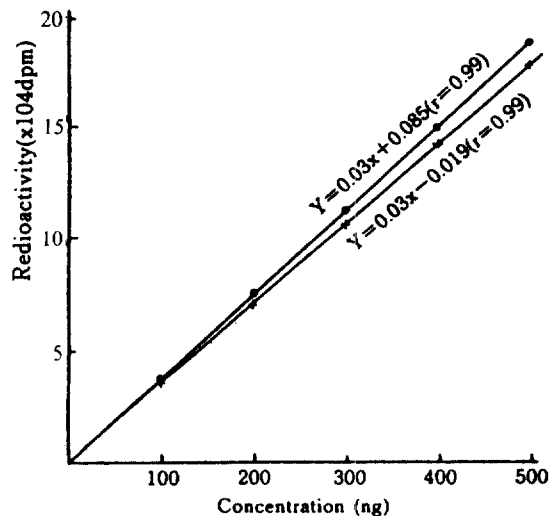


Figure 1. Standard calibration curve of ¹⁴C-Warfarin (○—○ : Toluene/Triton X-100 based cocktail solution. ×—× : Bray's solution)

ml)과 toluene-triton X-100 based solution(ppo 5.5g, popop 0.1 g, toluene 667 ml, triton X-100 333 ml)을 각각 사용하여 radioactivity를 비교하였다.

Figure 1은 ¹⁴C-warfarin(46mCi/m mol)을 500g까지의 농도 범위에서 두 cocktail 용액을 사용하여 radioactivity를 측정할 때 r=0.99의 양호한 직선관계를 얻었으며, toluene-triton X-100 scintillator solution를 사용했을 때 민감도가 다소 높았으며 간의 ¹⁴C-warfarin은 367dpm이었다. 또한 조직의 균

질액으로부터 ¹⁴C-warfarin의 회수율을 확인하기 위하여 3배용량의 methanol로 vortexing한 후 원심분리(2,000~3,000rpm)하여 radioactivity를 측정할 결과 2회 추출했을 때 98% 이상 회수되었다.

2.1.4. ¹⁴C-warfarin의 조직내 분포

14.8 μCi/kg의 ¹⁴C-warfarin을 200g의 흰쥐에 투여하고 시간의 경과에 따라 2.1.2.의 실험방법에 준하여 각 조직내 분포 및 요, 변으로 배설된 양을 측정할 결과는 Table 1에서와 같다.

Table 1. Distribution of radioactivity in the tissues of rat following a single dose of ¹⁴C-warfarin (100μg, 14.8μCi/kg) with 1.0ml of corn oil.

	Distribution of radioactivity							
	1 hour		4 hours		12 hours		24 hours	
	ng/g	%	ng/g	%	ng/g	%	ng/g	%
Blood(ml)	25	0.10	155	0.62	118	0.47	110	0.44
Heart	41	0.16	59	0.24	92	0.37	108	0.43
Kidney	69	0.28	105	0.42	142	0.57	203	0.18
Liver	183	0.73	203	0.81	324	1.30	416	1.66
Lung	70	0.28	81	0.32	166	0.66	215	0.86
Spleen	35	0.14	36	0.14	68	0.27	82	0.33
Stomach	423	1.69	264	1.06	118	0.47	72	0.29
Urine(T)	51	0.20	226	0.90	750	3.00	1887	7.50
Feces(T)	-	-	23	0.09	110	0.44	229	0.92
Stomach Content	4027	16.10	2935	11.70	693	2.77	136	0.54

Results are expressed as ng equivalents / g(ml) tissues(specificactivity 367 dpm/ng) and percentage of the present in each of tissues

2.2. 쿠마린 유도체류에 의하여 간에서 유도된 동위 효소들의 정제

2.2.1. 시약 및 장치

Coumarin은 Fluka Chemical Co.LTD, warfarin은 국보제약(주), N, N - methylenebisacrylamide, N, N, N', N' - tetramethylethylene diamine(TEMED), sodium dodecylsulfate(SDS), coomasie blue R-250, molecular weight protein standards(dalton marker: SDS-7); Sigma Chemical Co., octylsepharose CL - 4B; Phamacia Fine Chemicals., concentrator; Spectrum Medical Industries INC.,와 실험에 사용된 기기로는 densitomer: Gelman ACD - 18, high speed refrigerator centrifuge;

Damon/Model B - 200, spectrophotometer; Shimazu uv-240을 사용하였으며, 그밖에 실험에 사용된 시약은 분석용 특급 내지 1급을 구입하여 사용하였다.

2.2.2. 실험동물 및 루어

체중 200g 내외의 건강한 흰쥐(Sprague-Dawley)를 각 군당 여섯 마리씩 사용하였고 실험 전 1주일간 사육실의 환경에 적응시켰으며 사판되는 고품사료로 사육하였으며 corn oil에 용해시킨 coumarin(22.65mg/100g body weight), warfarin(10.8mg/100g body weight)을 매일 각 실험군에 3일 동안 같은 시간에 경구투여한 후 24시간 금식시킨 다음 stress로 회생시켜 실험하였다.

2.2.3. Microsomal fraction 분리

모든 동물은 stress를 가한 후 복부 정중선을 절개한 다음, 차가운 0.9% NaCl 용액으로 perfusion하여 혈액을 제거한 다음 간을 채취하여 homogenizer를 사용하여 0.25M ice-cold isotonic sucrose 용액으로 25% homogenate를 만들었다. 이를 냉동 원심분리기로 9,000g에서 20분간 원심분리하고 이의 상층액을 다시 9,000g에서 10분간 원심분리하여 침전되는 핵과 mitochondria층을 제거하였다. 이의 상층액을 105,000g에서 1시간 동안 초원심분리기로 분리하여 침전되는 microsome을 0.25M sucrose 용액으로 washing한 후 0.1M phosphate 완충용액(pH 7.5)으로 1g/ml가 되도록 균질 용액을 만들었다. 사용시까지 -40℃에 보관하였다.

2.2.4. Cytochrome p-450의 정제

Cytochrome p-450의 부분적 정제는 Beane 등¹³, Gibson 등¹⁴, Guengerich 등¹⁵⁻¹⁸과 Lu 등¹⁹의 실험을 참고로 하여 Netter 등¹²의 방법을 변형하여 수행하였다. Microsomal 균질용액은 Cyt. p-450의 용해를 위해 nonionic detergent인 triton N-101이 포함된 시료처리용 완충용액 10mM sodium phosphate(pH 7.2), 1 mM EDTA, 40%(W/V) triton N-101로 20mg protein/ml(시료용액)가 되도록 하였다.

Octyl Sepharose CL-4B를 column(i. d. 16mm, length 7cm)에 채우고 200ml의 증류수를 흘려 보낸 후, 50ml 이상의 완충용액 A[10mM sodium phosphate(pH 7.4), 1mM EDTA, 20%(W/V) glycerol, 0.5%(W/V) sodium cholate, 500mM NaCl]로 평형에 도달케 하였다. 여기에 시료용액 2ml를 가하고 3ml씩 10개의 시험관을 수집할 때까지 완충용액 A를, 다음 15개를 수집할 때까지 완충용액 B[10mM sodium phosphate (pH 7.4), 1mM EDTA, 20%(W/V) glycerol, 0.44%(W/V) sodium cholate, 400mM NaCl, 0.1%(W/V) Triton N-101]를 마지막으로 25개의 시험관을 모을 때까지 완충용액 C[10mM sodium phosphate(pH 7.4), 1 mM EDTA, 20%(W/V) glycerol, 0.2%(W/V) sodium cholate, 2%(W/V) triton N-101]를 각각 흘려 보냈다(30ml/hr). 수집된 시험관의 용액은 417nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.5. 전기영동에 의한 isozyme의 분리

Laemeli²⁰ 방법에 따라 수행하였으며, gel의 조성은 Table 2와 같으며, gel이 완전히 굳은 후 comb을 제거

하고 각 well을 증류수로 닦아준 후 뒤집어 말린 후 다시 똑바로 세운 다음 각 well을 전개용 완충용액으로 채운 다음 Hamilton syringe를 사용, 각 well에 2.2.4에서 정제하여 얻은 용액을 concentrator로 농축시킨 후 시료처리용 완충용액을 넣고 90초간 끓는 물에 넣었다가 꺼내어 상온으로 냉각시킨 시료를 주입한 후 gel을 electrophoresis chamber에 끼우고 50V의 전압으로 전개시키는 동안 열의 발생을 막기 위해 4℃의 물을 순환시켜 주었다. Tracking dye가 위로부터 running gel에 10cm 이상을 지날 때 전기를 끄고 gel을 꺼내어 염색용액에 2시간 이상 담가 둔 다음 탈색용액 I에 2~3시간 넣었다가 다시 꺼내어 탈색용액 II가 들어 있는 destainer에 넣고 탈색시켜 densitometer로 550nm에서 관찰하였다. 새로이 나타난 protein band의 분자량은 molecular weight markers(bovin albumin, eggalbumin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, carbonic anhydrase, trypsinogen, trypsin inhibitor, α -lactalbumin)을 표준물질로 하여 작성된 점정선에서 구하였다.

Table 2. Partipation of the gel solution

	running gel 10% T. 2.7% C	stacking gel 4% T. 2.7% C
30% T. 2.7% C _{Bis}	20 ml	2.66ml
1.5M Tris-Cl pH 8.8 buffer	15 ml	-
0.5M Tris-Cl pH 6.8 buffer	-	5.00ml
10% SDS	0.6ml	0.20ml
H ₂ O	24 ml	12.20ml
10% ammonium persulfate	300 μ l	100 μ l
TEMED	20 μ l	10 μ l

(1) Monomer solution(30% T, 2.7% C_{Bis}): Acrylamide 58.4g, bisacrylamid 1.6g을 물에 녹여 200ml로 하여 4℃ 어두운 곳에서 보관한다.

(2) Running gel 완충용액(1.5M Tris-Cl pH 8.8): Tris(hydroxymethyl) aminomethan 36.3g을 증류수로 녹여, HCl 용액으로 pH를 8.8 되게 맞추고 최종 부피를 200ml로 한다.

(3) Stacking gel 완충용액(0.5M Tris-Cl pH 6.8): Tris(hydroxymethyl) aminomethan 3.0g을 증류수로 녹여, HCl 용액으로 pH를 6.8 되게 맞추고 최종 부피를 50ml로 한다.

(4) 시료 처리용 완충용액(2 × treatment buffer); Tris (hydroxymethyl) aminomethan 1.51g 과 glycerol 20.0m/를 증류수 35m/에 녹여 HCl 용액으로 pH를 6.75 로 맞춘 후 sodium dodecylsulfate 4.0g, 2-mercaptoethanol 10.0m/, bromophenol blue 0.002g을 첨가하고 용액을 10m/ 되게 한다. 4℃에서 보관한다.

(5) 전개시 완충용액(0.025M tris pH 8.3, 0.192M Glycerol, 0.1% SDS); tris(hydroxymethyl) amino-methan 12g, glycerol 57.6g, 10% sodium dodecyl-sulfate 40m/를 증류수로 녹여 4 liter로 한다.

(6) 염색용액(1% Coomassie blue R-250); 2%-Coomassie blue R-250 용액 62.5m/에 methanol 250m/, acetic acid(99.0%) 50m/를 첨가하고 증류수로 500m/가 되게 한다.

(7) 탈색용액 I (50% methanol, 10% acetic acid); methanol 500m/에 acetic acid(99.9%) 100m/를 첨가하고 증류수로 1 liter가 되게 한다.

(8) 탈색용액 II (7% acetic acid, 5% methanol); acetic acid (99.9%) 280m/에 methanol 200m/를 첨가하고 증류수로 4 liter가 되게 한다.

3. 결과 및 고찰

3.1 ¹⁴C-warfarin의 흡수 및 조직내 분포

14.8μCi의 ¹⁴C-warfarin을 200g의 흰쥐에 투여한 후 1시간이 경과되었을 때의 위내용물에는 약 16%의 ¹⁴C-warfarin이 흡수되지 않고 남아 있었으며, 24시간 후에는 약 0.5%로 거의 흡수되었다. 혈액의 농도는 4 시간 후가 가장 높은 m/당 155ng으로 혈액량을 체중의 8%로 계산했을 때 약 10%에 달하였다.

특히 간에서의 농도는 시간의 경과에 따라 점차 높아져서 24시간 후에는 416ng/g의 ¹⁴C-warfarin을 함유하고 있었다. 그러나 신장, 폐장, 심장 및 비장에서 농도 변화는 시간의 경과에 따라 흡수 함량이 증가되었으나 높은 축적도를 보이지 않았다.

또한 변으로 배설되는 양은 의외로 적어서 1시간 후에는 배변량이 거의 없었고, 24시간 후에도 투여한 ¹⁴C-warfarin의 약 1%밖에 배설되지 않았다. 그러나 Table 1 및 3에서와 같이 요에서는 시간이 지나갈수록 그 배설량도 크게 증가되어 24시간 후에는 투여량의 7.5%였다. 혈액의 총량을 체중의 8%로 계산했을 때 투여한 ¹⁴C-warfarin의 약 7%가 순환혈액에 함유되어 있으며, 요의 배설된 양은 약 7.5%였다. 또한 변으로

배설된 양 0.9%를 포함하여 총 15.4%가 확인되었으나 대부분은 체내 각 조직에 축적되어 있음을 알 수 있었다.

그러나 완전히 분해되어 ¹⁴CO₂로 배설된 것이 있을 지도 모른다. 또한 요로 배설되는 총량은 점진적으로 증가하고 있지만 요의 배설량은 약 200ng/m/로 거의 일정한 비율로 체외로 배설되었으며 Figure 2에서와 같이 혈액내의 함량도 12시간 후부터는 급격히 감소되지 않았다.

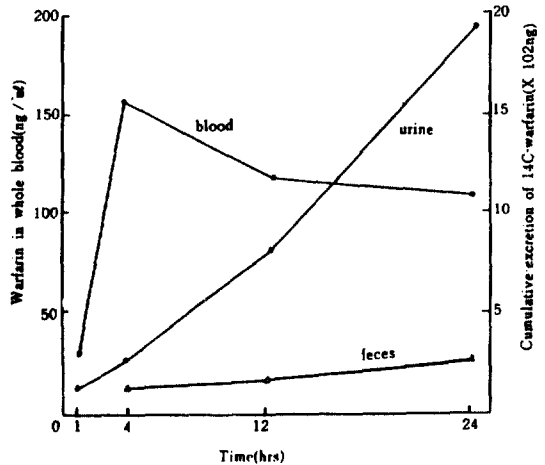


Figure 2. The Concentration and excretion of radioactivity in blood, urine and feces of rats after single oral dose of ¹⁴C-warfarin (100μg, 14.8μCi / kg)

¹⁴C-warfarin의 생체내 대사에 관하여 여러 학자들이 보고한 바 있으나^{6,8,9} 이들 대부분이 주 대사기관인 간 microsome 분획을 이용하여 in vitro에서 관찰하였다. 그러나 이 연구의 목적은 체내에 흡입된 ¹⁴C-warfarin 이 시간의 경과에 따라 어느 장기에 얼마 동안 축적 또는 잔류하는지를 추구함으로써 이들의 오용으로 인한 사고 발생시 각 장기별 농도를 결정하여 감정에 이용성을 검토하는 기초자료를 얻고자 본 실험을 하였다.

¹⁴C-warfarin의 인체에 대한 독성은 prothrombin의 형성을 억제함으로써 capillary fragility를 증가시키고 나아가서 hemorrhage을 유발하여 실제로 ¹⁴C-warfarin 중독군을 biopsy했을 때 특히 폐는 내출혈된 혈액으로 인해 크게 손상되어 있었으며 정상군에 비해 크게 비대하여 있음을 볼 수 있었다.

Oxameticin²¹이나 coumarin²²과는 다르게 쉽게 체외로 배설되지 않았으며, 따라서 배설기관인 신장에도 그 축적도가 이들보다 훨씬 낮았다. 반대로 간 및 혈액 내에는 24시간 후까지도 점차 축적도가 증가되는 것으로 보아 이들보다 오래 잔류함을 알 수 있었다. 또한 제초제인 bentazon은 흰쥐에서 24시간 이내에 93%가 요로 배설되었고²³ coumarin은 baboon에서 6시간 이내에 70~80% 배설되는 반면 본 실험에서는 24시간 내에 요로 배설되는 양이 7.5%였다(Table 3). 이러한 것은 ¹⁴C-warfarin의 높은 잔류성과 축적을 나타낼 뿐만

아니라, 실험동물의 species에 따라서도 크게 차이가 있음을 암시해 준다.

따라서 ¹⁴C-warfarin의 중독시 분석에 적합한 시료로는 투여량과 처사시간에 따라 다소 차이는 있겠지만 미대사 물질의 잔류성이 높은 위내용물이나 각 장기조직 중에서 함량이 높은 간장, 신장, 폐장 또는 체액이며 분비물 중에서는 요 등이 적당할 것으로 생각된다. 그러나 metabolite들의 분석을 통한 접근방법도 바람직할 것으로 생각된다.

3.2 동위호소들의 정제

3.2.1 정제

정상군과 함께 coumarin, warfarin에서 얻어진 microsome 균질용액(g/ml)을 concentrator를 이용하여 5배로 농축시킨 다음 시료처리용 완충용액을 같은 부피로 넣어 준다. 이 처리된 시료 2ml(20mg protein/ml)을 완충용액 A로 이미 평형을 이루고 있는 Octyl Sepharose CL-4B column에 주입한다. 3m/씩 10개의 시험관을 수집할 때까지 완충용액 A를, 다음 15개 시험관까지 완충용액 B를, 마지막 25개를 받을때까지 완충용액 C를 유속 30ml/hr로 유출시켰다. 각 시험관의 용출액을 헴(heme) 단백질의 흡수대인 417nm에서 흡광도를 측정하여 Figure 3을 얻었다.

Table 3. Excretion and retention of radioactivity in rat tissue after oral administration of ¹⁴C-Warfarin within a day.

	recovery of ¹⁴ C-Warfarin(% of dose)
Urine	7.5
Feces	0.9
Blood	7.0
Expired CO ₂	?
Carcass/viscera	?
Total	15.4

Total volume of blood was expressed as a 8% body weight.

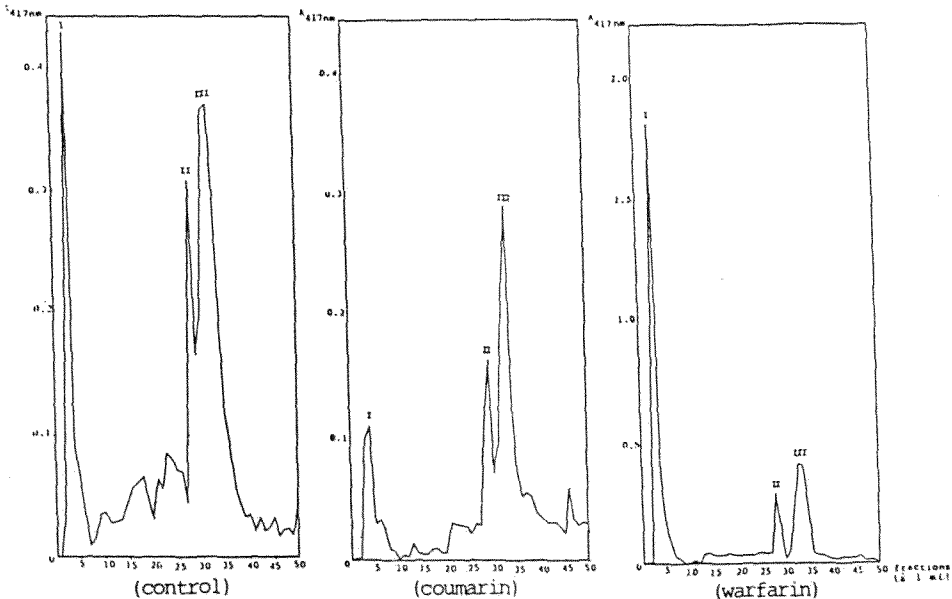


Figure 3. Elution profile of control and pretreated coumarin, warfarin rat solubilized microsomes on an Octyl Sepharose CL-4B column.

- * control (peak I 2-7, II 27-29, III 30-36)
- coumarin (peak I 2-7, II 27-30, III 31-36)
- warfarin (peak I 2-7, II 27-30, III 31-36)

3.2.2. Isozymes pattern

정제 과정에서 서로 유사한 pattern을 얻은 정상군과 coumarin, warfarin 투여군의 분리된 Peak I, II, III의 각 fraction들을 수집하여, 각각 농축시킨 시료를 시료처리용 완충용액(2×treatment buffer)으로 처리하였다. 약 20μg portein을 gel에 주입시키고 50V의 전압을 걸어 전개시켜 densitometer를 이용 550nm에서 각 band들을 관찰한 결과 정제 전 portein band들의 pat-

tern과 정제 후 peak I, II를 수집하여 농축시킨 시료에 대한 전기영동상의 protein band들의 pattern은 유사함을 보이고 있으나, Figure 4에서 Peak III에 대한 시료에서는 Cytochrome P-450이 분리되는 50Kd 부근의 protein band들이 서로 다른 pattern을 보이고 있다. 즉 정상군의 경우 50.8Kd 부근의 1개의 band를 볼 수 있으며, coumarin 투여군의 경우 51.3Kd와 55.2Kd의 2개의 band들이 보이며, warfarin 투여군은 50.7Kd, 54.6Kd 및 57.2Kd의 3개의 band들이 분리되었다.

이들 각 band의 분자량은 molecular weight marker 들로 bovine albumin(66.0Kd), egg albumin(54.0Kd), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36.9Kd), carbonic anhydrase(29.0Kd), trypsinogen(24.0Kd), trypsin inhibitor(20.1Kd), α-lactalbumin(14.2Kd)를 사용하여 Figure 5를 얻었다.

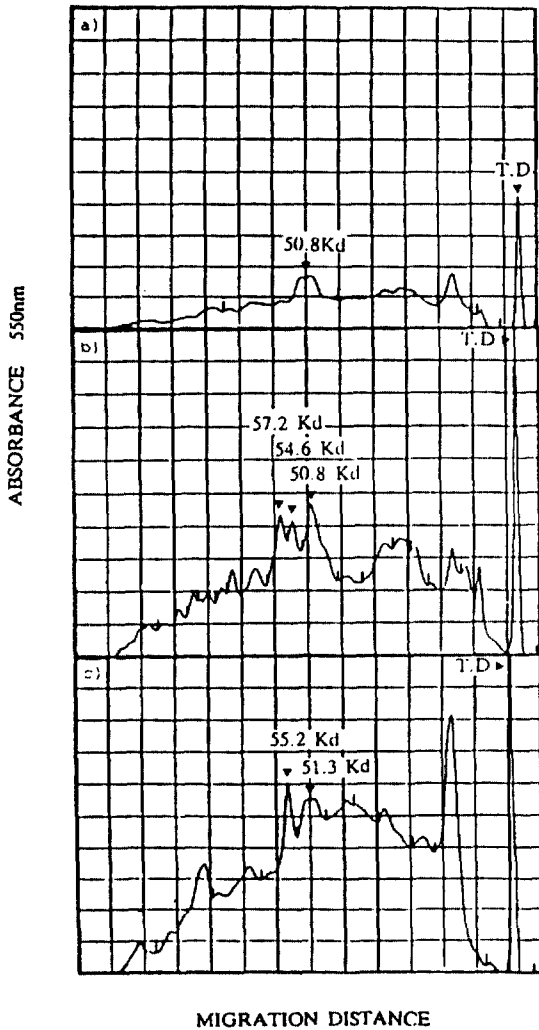


Figure 4. Densitometry of Octyl Sepharose CL-4B peak III fractions.

(a. control; b, warfarin pretreated; c, coumarin pretreated)

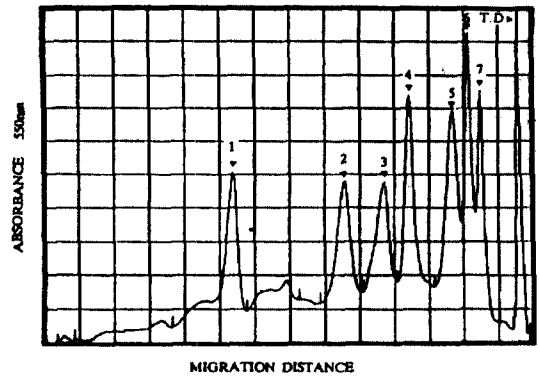


Figure 5. Densitometry molecular weight markers.

- 1, bovine albumin(66.0 Kd);
- 2, egg albumin(45.0 Kd));
- 3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36.0 Kd);
- 4, carbonic anhydrase(29.0 Kd);
- 5, trypsinogen(24.0 Kd);
- 6, trypsin inhibitor(20.1 Kd);
- 7, α-lactalbumin(14.2 Kd).

Netter 등¹²은 sodium warfarin을 흰쥐에 투여한 결과 Cyt. P-450의 증가와 함께 새로운 protein band를 전기영동상에서 관찰하였음을 보고하였고, 본 연구에서는 coumarin과 warfarin을 흰쥐에 투여하여 Cyt. P-450의 isozyme들이 유도되는지를 관찰하기 위하여 Octyl Sepharose CL-4B column상에서 염(salt)인 so-

dium chloride와 ionic detergent인 sodium cholate 및 nonionic detergent인 triton N-101의 조성을 변화 시키는 정제과정에서 유사한 profile을 보이며 가장 많은 량의 증가를 가져온 warfarin과 모체인 coumarin에 대해 정상군과 함께 정제 전후를 전기영동에서 protein pattern을 비교해 본 결과 Cyt. P-450의 부분적 정제 전에는 그 pattern이 유사하여 구분이 어려웠으나 정제 후 얻은 peak III을 농축하여 전기영동을 실시한 결과 Cyt. P-450이 분리되는 50Kd 부근의 band가 상이함을 densitometry를 이용하여 좀더 명확히 관찰할 수 있었다.

그러나 warfarin에 대한 Netter¹²의 실험에서는 56.4Kd의 새로운 protein band가 나타났으며 정상군과 비교 50.2Kd의 band가 더 뚜렷해졌다고 보고하였다. 이와 같은 결과간의 차이점은 전기영동 전개조건에 기인되는 것으로 Netter 등의 경우는 stacking gel을 20mA로 1시간, runing gel을 40mA 2시간 전개시킴으로써 약 10cm gel을 3시간에 걸쳐 전개시켰으나 본 실험에서는 50V로 13시간 전개시켰다. 그러므로 본 실험의 결과인 50.8Kd와 54.6Kd는 Netter 등의 경우 정상군에 비해 좀더 뚜렷해진 50.2Kd에 해당하고, 57.2Kd는 Netter 등의 56.4Kd에 해당하는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과에서 정상군의 50.8Kd와 coumarin의 51.3Kd 및 warfarin의 50.8Kd는 유사한 분자량의 protein band로 생각되며, coumarin의 55.2Kd와 warfarin의 54.6Kd 역시 유사한 분자량의 protein으로 추정되고 이들은 정상군과는 다른 새로운 band들이다. Coumarin에 비해 친유성의 치환기를 갖는 warfarin의 경우 coumarin과 달리 보다 큰 분자량의 protein band가 하나 더 나타났음은 흥미있는 일이라 하겠다. 정상군과 달리 새로이 나타난 protein band들은 염(salt) 및 detergent 등에 대해 같은 용해도를 가지며 50Kd 부근의 분자량을 갖는 Cyt. P-450의 isozyme으로 생각되며, 본 실험에서 coumarin의 경우 Cyt. P-450의 2배의 증가와 함께 2개의 isozyme들이 warfarin의 경우 Cyt. P-450의 3배 증가와 함께 3개의 isozyme들이 관찰되었다.

4. 결 론

¹⁴C-warfarin의 경구투여시 시간변화(1~24시간)에 따른 분포비는 요 7.5%, 변 0.9% 및 혈액 7%이고 혈액 중 4시간 경과시 0.62%로 최고치이며, 24시간 경과시 0.44% 감소하였고 또한 각 장기 조직의 분포비는 간장

(1.66%), 폐장(0.86%), 신장(9.81%), 심장, 비장 순으로 나타났다.

Coumarin과 warfaein을 투여한 흰쥐의 간조직 microsome 내의 Cyt. P-450을 Octyl Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography로 정제 후 전기영동상에서 전개시킨 결과, 정상군에서는 50.8Kd의 1개의 band만을 얻을 수 있으나, coumarin 투여군의 경우는 51.3Kd와 55.2Kd로 2개의 band들이 분리되었고, warfarin의 경우는 50.8Kd, 54.6Kd, 57.2Kd의 3개의 band들이 관찰되었으며, 이들 화합물들에 의해 microsome electron transport system이 증가됨과 Cyt. P-450의 isozyme들이 유도됨을 알 수 있었다.

인용문헌

1. Bell, *Biochemistry*, **11**, 1959 (1979).
2. E. C. Hagen, et al., *Fed. Cosmet., Toxicol.*, **5**, 141 (1967).
3. M. H. Salaman, et al., *J. Cancer.*, **9**, 177 (1955).
4. F. U. Bar, et al., *Medizin Ernahr.*, **8**, 244 (1967).
5. F. Griepentrag, *Toxicology*, **1**, 93 (1973).
6. A. W. Wood. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5641 (1979).
7. S. D. Gangolli, et al., *Biol. Chem. Soc. Trans.*, **2**, 301 (1974).
8. D. N. Memartin, et al., *Toxicol. and Appli. Pharmacol.*, **54**, 411 (1980).
9. D. S. Kaminsky, et al., *J. Biol. Chem.*, **255**, 85 (1980).
10. G. Feuer, *Chem. Biol. Interact.*, **2**, 1'03 (1990).
11. G. Feuer, *Can. J. Physiol. Phamc.*, **34**, 85 (1985).
12. K. J. Netter. W. Regrum and L. Kling, *Biochem. Phamc.*, **34**, 85 (1985).
13. P. Beaune and P. Dansetie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 826 (1979).
14. G. G. Gibson and J. B. Schenkman, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5957 (1978).
15. F. P. Guengerich, *Mol. Pharmacol.*, **13**, 911 (1977).
16. F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3970 (1977).
17. F. P. Guengerich, D. P. Ballou and M. J. Coon. *J. Biol. Chem.*, **250**, 7405 (1975).
18. F. P. Guengerich and M. V. Martin. *Arch. Bio chem.*, **251**, 4659 (1976).
19. A. Y. H. Lu, M. T. Huang and S. B. West, *J. Biol. Chem.*, **251**, 4659 (1976).
20. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
21. L. F. Eism. et al., *Arzneim-Forsch/ Drug Res.*, **29**(II), 1155 (1979).