

Free radical 에 의한 지질과산화와 단백질산화에 대한 α -tocopherol의 항산화효과

정 정 원 · 허 린 수*

농촌진흥청 가축위생연구소
경북대학교 수의과대학*
(1994년 3월 28일 접수)

The antioxidative effects of α -tocopherol on the lipid peroxidation and protein oxidation by free radicals

Chung-won Chung, Rhin-sou Huh*

Veterinary Research Institute, RDA
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University*
(Received March 28, 1994)

Abstract: This study was carried out to investigate the inhibitory effects of vitamin E on the oxidative damage of cellular lipids and proteins in free radical reaction induced by FeCl_3 and ascorbic acid.

In this experiment, a vitamin E treated rat group was administered with 100mg/kg body weight of *dl*- α -tocopheryl acetate and an untreated rat group was administered with the same volume of corn oil. And then assays of malondialdehyde and carbonyl group in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of rat liver were carried out at the scheduled time.

The results obtained from this study were summarized as follows;

1. Lipid peroxidation levels in vitamin E administered rat liver cells were significantly ($p < 0.05$) decreased at the intervals between 1 hour and 4 hours in liver homogenate, at all times except for 1 hour point in mitochondrial fraction, and also at the intervals between 0.5 hour and 3 hours in microsomal fraction compared with those of the control rat liver cell.

2. Protein oxidation levels in vitamin E administered rat liver cell were also significantly ($p < 0.05$) decreased at the intervals between 1.5 hours and 4 hours in liver homogenate, at over 4 hours in liver mitochondrial fraction, and at the intervals between 0.5 hour and 3 hours in liver microsomal fraction compared with those of the control rat liver cells.

Key words : free radical, α -tocopherol, antioxidative effect

서 론

최근 노화, 발암 등과 같은 많은 질환과 생체내 지질, 단백질 등 주요 물질의 변성 및 파괴의 원인을 설명하

는데 활성산소와 관련된 free radical 이론이 많이 논의되고 있다.^{1,2,3,4}

Free radical이란 한 개 이상의 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 총칭하는 것으로 superoxide anion(O_2^-), 과

산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical($\cdot OH$), singlet oxygen ($\cdot O_2$), lipid radical($L\cdot$), lipid peroxy radical($LOO\cdot$), lipid alkoxyl radical($LO\cdot$) 등이 그 영역에 속하며 이들은 비 radical 화합물로 부터 homolytic fission 또는 heterolytic fission에 의해 한 개의 전자를 잃거나 얻음으로써 생성된다.^{5,6} 이들 free radical의 생성원으로는 mitochondria, microsomes, peroxisome 등의 세포파립과 cytosol 및 대식구 등이 있으며 이들 장소에서 free radical은 정상적으로 생성되거나 항생제, 항암제, 독성화합물, 기타 전이금속 등의 작용으로 여러가지 기전을 통해 생성된다고 알려져 있다.^{6,7,8} 이러한 free radical에 의해 일어나는 여러가지 생체내반응에는 세포 또는 세포 소기관의 막지질 과산화에 의한 microsome, mitochondria 등의 소기관 손상, 효소단백질중의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 손상, 생체내로 침입한 병원체에 대한 대식구의 방어과정에서 생겨나는 주위조직의 손상, 그리고 DNA 손상에 의한 세포의 암화(carcinogenesis) 등이 있다.^{1,4,8,9,10,11}

체내와 체외에서의 여러가지 free radical 반응에 대한 연구가 계속 진전되어 최근에는 식이와 free radical 반응의 관계, 기호식품인 술, 담배 등과 free radical과의 관계, 그리고 역학적인 측면과 free radical과의 관계 등 여러 분야에서 연구자들의 관심이 집중되고 있으며, 이러한 관심은 free radical반응을 막는 항산화제에 대한 연구를 촉진시켰다.⁷

일반적으로 생체내에서 항산화제는 그 작용기전에 따라 free radical의 발생을 미연에 막는 system I과 이미 생성된 free radical을 포착, 제거하는 system II가 있으며, 경우에 따라서는 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제로 대별되기도 한다.⁷ 예를 들면 ceruloplasmin, lactoferrin, transferrin, glutathion peroxidase, catalase 등은 지질과산화물($LOOH$)이나 과산화수소로부터 $LO\cdot$ 나 $\cdot OH$ 과 같은 지질과산화를 유도하는 free radical의 산생을 막음으로써, 예방적으로 작용하는 system I 항산화제이다.

한편 vitamin E, vitamin C, uric acid, superoxide dismutase 등은 $\cdot OH$, $LO\cdot$, $\cdot O_2$ 를 포착하여 지질과산화의 유도반응을 저해하거나 $LOO\cdot$ 을 포착하여 지질과산화의 증폭반응을 정지시켜 일종의 radical 소거제로 작용하는 system II 항산화제이다.^{7,12,13,14} 이러한 system II 항산화제 중 식이를 통해 보충가능하며 생체막에 주로 존재하는 지용성 vitamin인 tocopherol(Toc)은 막지질에서 생성되는 $LOO\cdot$ 와 $LO\cdot$, $\cdot OH$ 를 포착($LOO\cdot + Toc \rightarrow LOOH + Toc\cdot$)하여 항산화작용을 하며, 세포질에 주로 존재하는 ascorbic acid 수용액중의 \cdot

OH 와 $\cdot O_2$ 등을 소거($\cdot OH + ascorbic\ acid \rightarrow H_2O + ascorbic\ acid\cdot$)함으로써 항산화작용을 하는 것으로 밝혀져 있다.^{7,15,16} 또한 이들 두 항산화제를 동시에 사용시 화학적으로 vitamin C가 환원된 vitamin E를 재생시킴으로써 항산화효과를 더 오래 지속할 수 있도록 하는 항산화효과의 상승작용을 보인다고 보고된¹⁶ 바 있으나, ascorbic acid의 단독 사용시에는 그 농도와 전이금속의 존재유무에 따라 항산화작용에서 조산화작용으로 바뀔 수도 있다고 보고되었다.^{17,18}

이 실험에서는 체내에서 transferrin, hemoglobin, myoglobin 등에 존재하는 가장 풍부한 전이금속의 일종인 철에 의하여 유도된 free radical 반응에 따른 지질과산화 및 단백질산화 반응과 이에 대한 vitamin E의 작용을 알아 봄과 동시에 간내 각 세포소기관별 항산화능의 차이를 비교하고 아울러 vitamin E의 세포내 대사 추이를 살펴보고자 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경 : 실험동물은 체중 90-120g인 Sprague-Dawley계 6주령 rat(수컷)을 가축위생연구소 SPF 실험동물 사육실에서 분양받아 고품사료(제일제당) 및 물을 무제한 급여하면서 2일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

Vitamin E의 처리 : Rat를 24시간 동안 절식시킨 다음 군당 5마리씩 2개군으로 나누어 vitamin E 투여군의 경우 100mg/ml의 *dl-a*-tocopheryl acetate(Sigma Co)를 corn oil에 희석하여 체중 kg당 1ml씩 복강내에 주사하였으며 vitamin E 비투여군의 경우 동량의 corn oil만을 주사하였다.

간장의 채취 : *dl-a*-tocopheryl acetate 투여군과 비투여 대조군을 18시간째에 다같이 희생시켜 간장을 적출하여 10mM 인산완충액(pH 7.2)으로 관류(perfusion) 후 무게(wet weight)를 측정하였으며 총 무게의 1/3은 10mM 인산완충액에 넣어 10%(W/V) 균질액을 만들었고 나머지 2/3는 mitochondria와 microsome의 분리를 용이하게 하기 위해 sucrose 배지(0.25M sucrose, 10mM tris HCl, 0.5mM EDTA pH 7.2)에 넣어 10%(W/V) 균질액을 만들었다. 이 두 가지 시료를 모두 5°C 상태로 유지하면서 균등기로 간조직을 완전히 균질화(800rpm에서 2분)시켜 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

Mitochondria와 microsome의 분리 : Sucrose 배지에 부유시킨 10% 간 균질액을 1,000xg에서 15분간 원

심후에 상층액을 취하여 10,000xg(Beckman SW 28Ti)에서 15분간 원심하여 침전된 mitochondria 분획을 얻었으며, 남은 상층액을 100,000xg(Beckman SW 41Ti)에서 60분간 원심하여 침전된 microsome 분획을 얻었다.

Free radical 반응의 유도 : 인산완충액(10mM)에 부유시킨 간 균질액, 간세포내 mitochondria 및 microsome 분획을 에펜돌프튜브에 분취한 후 ascorbic acid와 FeCl₃ 용액을 각각 0.05mM과 0.1mM 되도록 첨가한 후 37°C에서 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 및 4시간 동안 반응시켜 이를 분석실험에 이용하였다.

MDA의 함량측정 : 간 균질액, 간세포내 mitochondria 및 microsome 분획의 부유액에 대한 MDA 함량은 Ohkawa 등¹⁹의 방법에 의해 측정하였다. 먼저 free radical 반응을 유도하기 위해 37°C에서 배양시킨 시료들을 각각 0.35ml씩 시험관에 취하고 0.2ml의 8.1% sodium dodecyl sulfate 수용액과 1.5ml의 20% acetic acid(pH 3.5), 그리고 1.5ml의 0.8% thiobarbituric acid 수용액을 첨가한 후 증류수로 채워 총 부피가 4ml가 되게 만들었다. 이 후 95°C에서 60분간 가열하고 식힌 후 1ml의 증류수와 5ml의 n-butanol:pyridine (15:1, V/V) 혼합액을 첨가하여 진탕기로 강하게 섞은 다음, 4,000rpm(model DPR6000 rotor 286)에서 10분간 원심한 후 상층액을 취하여 532nm에서 시료내의 MDA 함량을 산정하였다. 이때 바탕시료로서 n-butanol과 외부표준시료로서 1,1,3,3,3-tetramethoxy propane을 사용하였다.

Carbonyl group의 함량측정 : 간 균질액, 간세포내 mitochondria 및 microsome 분획의 부유액에 대한 carbonyl group 함량은 Levine 등²의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 37°C에서 반응시킨 시료를 0.45ml씩 에펜돌프튜브에 취하여 50 μ l의 10% streptomycin sulfate와 섞어 5분간 얼음속에서 놓아 둔 뒤 1,000xg(Heraeus Biofuge model 13)에서 5분간 원심 후 상층액을 취하여 동일 부피의 20% trichloroacetic acid (TCA)를 처리하여 단백질을 침전시킨 후 1,000xg에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 단백질에 0.5ml의 10mM 2,4-dinitrophenylhydrazine(2N HCL에 녹인 수용액)을 첨가하여 1시간동안 37°C에서 진탕배양한 후, 0.5ml의 20% TCA를 첨가하여 원심하였으며 반응한 단백질을 회수하여 1ml의 ethanol:ethyl acetate(1/1,V:V) 혼합액을 사용하여 두 번 세척하였다. 그 후 0.6ml의 6M guanidine(20mM potassium phosphate에 녹인 후 trifluoroacetic acid로 pH 2.3으로 만든것)을 가해 37°C 15분간 방치시켜 재용해한 후 10,000xg에

서 10분간 원심하여 상층액을 취하여 바탕시료(D.W)에 대한 360-390nm 사이 파장에서의 흡광상을 측정하여 최고흡광도를 보이는 파장(본 실험에서는 368 nm)에서 각 시료의 흡광도를 측정후 지방족 hydrazone 화합물의 평균분자흡광계수를 21.0M⁻¹cm⁻¹로 삼아 carbonyl group의 mole수를 산정하였다.

통계 처리 : 이 실험에서 얻은 성적은 평균±표준오차(mean±S.E)로 나타내었으며 Student t-test에 의하여 유의성 검정을 실시하여 p value가 0.05이하시 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

Rat의 간 균질액내 지질과산화 : 반응시간별 rat의 간균질액내 MDA 함량은 0시간과 0.5시간을 제외한 1시간부터 4시간까지의 모든 시간대에서 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 유의성 있는 (P<0.05) 차이를 보였으며 가장 높은 MDA 생성량을 보인 시간대와 그 함량은 vitamin E 비투여군이 4시간째에 12.8±1.8nmol/mg protein 을 보임으로써 0시간째보다 6.8배 증가를, vitamin E 투여군에서는 4시간째에 3.6±0.9nmol/mg protein을 보임으로써 0시간째보다 2.08배 증가를 나타내었다(Fig 1). 반응곡선의 증가경향을 비

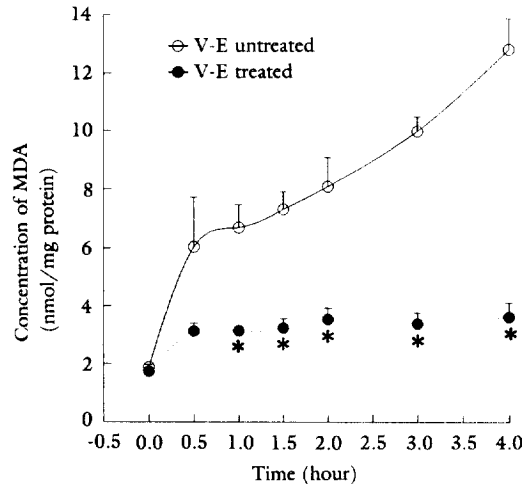


Fig 1. Comparison of the free-radical induced MDA levels in vitamin E treated and untreated rat liver homogenate.

The results are expressed as a mean±S.E. obtained from 3-5 tests.

*: p<0.05 compared with vitamin E untreated group.

교했을 때, vitamin E 비투여군에서는 0.5시간째부터 계속하여 급상승곡선을 이루는데 비해서 투여군에서는 4시간째까지 거의 증가되지 않았다.

Rat의 간 균질액내 단백질 산화 : 반응시간별 rat의 간 균질액내 carbonyl group 함량의 변화는 1.5시간과 4시간에서 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해서 유의성 있는($p < 0.05$) 차이를 보였으며, 가장 높은 증가치를 보인 시간대와 그 함량은 vitamin E 비투여군의 경우 1.5시간째에 $1.4 \pm 0.08 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보였고 투여군에서는 4시간째에 $1.3 \pm 0.01 \text{ nmol/mg protein}$ 을 나타내었다(Fig 2). 반응곡선의 증가경향은 vitamin

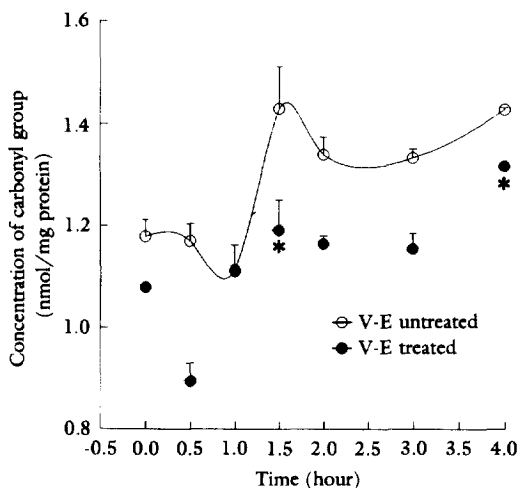


Fig 2. Comparison of the free-radical induced carbonyl group levels in vitamin E treated and untreated rat liver homogenate.

The results are expressed as a mean \pm S.E. obtained from 3-5 tests.

*: $p < 0.05$ compared with vitamin E untreated group.

E 투여군과 비투여군에서 모두 미약하였다.

Rat의 간세포내 mitochondria 분획의 지질 과산화 : Rat의 간세포내 mitochondria 분획의 반응시간별 MDA 함량의 변화는 1시간째를 제외한 모든 시간대에 걸쳐 vitamin E 투여군에 비해 유의성 있는($p < 0.05$) 차이를 보였는데 비투여군에서는 반응유도 후 30분만에 $0.7 \pm 0.33 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보였고 투여군에서는 4시간째에 거의 같은 함량을 보였다. 가장 높은 증가치를 보인 시간대와 그 함량은 vitamin E 비투여군의 경우 4시간째에 $1.35 \pm 0.15 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보였으나, 투여군의 경우 4시간째에 $0.7389 \pm 0.4434 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보였었다(Fig 3). 반응곡선의 증가경향은

vitamin E 비투여군의 경우 처음부터 투여군의 2배 정도의 함량에서 시작하여 1시간경에 급격한 증가를 보였으나, 투여군의 경우 3시간째까지는 둔한 증가를 보

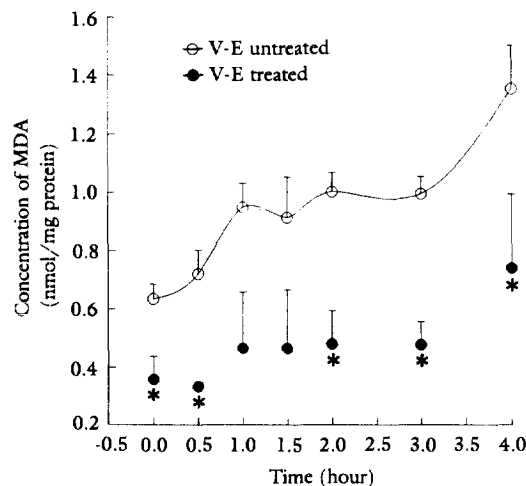


Fig 3. Comparison of the free-radical induced MDA levels in vitamin E treated and untreated rat liver mitochondria.

The results are expressed as a mean \pm S.E. obtained from 3-5 tests.

*: $p < 0.05$ compared with vitamin E untreated group.

이다가 4시간째에 급격하게 증가되었다.

Rat의 간세포내 mitochondria 분획의 단백질 산화 : Rat의 간세포내 mitochondria 분획의 반응시간별 carbonyl group 함량의 변화는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 0시간에서 3시간째까지는 유의성을 인정할 수 없는($p > 0.05$) 작은 양의 차이를 보이다가 4시간째 부터는 유의성 있는($p < 0.05$) 차이를 보였다(Fig 4). 가장 높은 증가치를 보인 시간대와 그 함량은 vitamin E 비투여군의 경우 4시간째에 $0.95 \pm 0.33 \text{ nmol carbonyl group/mg protein}$ 을, 투여군의 경우 3시간째에 $0.49 \pm 0.25 \text{ nmol carbonyl group/mg protein}$ 을 나타내었다.

Rat의 간세포내 microsome 분획의 지질 과산화 : Rat의 간세포내 microsome 분획의 반응시간별 MDA 함량의 변화는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해서 0.5시간에서 3시간째까지 유의성 있는($p < 0.05$) 차이를 보였는데, 가장 높은 증가를 보인 4시간째에 vitamin E 비투여군이 $22.7 \pm 5.2 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보임으로써 0시간째보다 6.8배 증가를, 투여군에서는 $16.38 \pm 0.48 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보임으로써 0시간째보다 6.2배

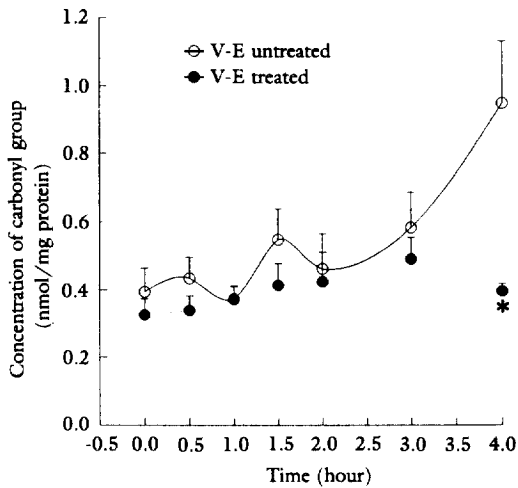


Fig 4. Comparison of the free-radical induced carbonyl group levels in vitamin E treated and untreated rat liver mitochondria. The results are expressed as a mean \pm S.E. obtained from 3-5 tests. *: $p < 0.05$ compared with vitamin E untreated group.

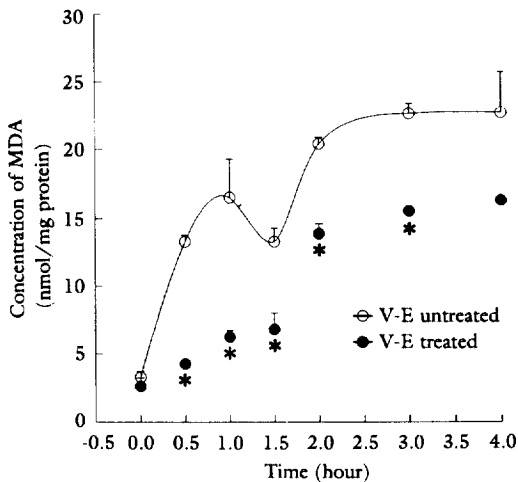


Fig 5. Comparison of the free-radical induced MDA levels in vitamin E treated and untreated rat liver microsomes. The results are expressed as a mean \pm S.E. obtained from 3-5 tests. *: $p < 0.05$ compared with vitamin E untreated group.

증가되었다(Fig 5). 증가폭선을 비교했을 때 vitamin E 비투여군에서는 0.5시간째부터 급격하게 증가되었으

나, 투여군에서는 2시간 이후부터 급격하게 증가되었다.

Rat의 간세포내 microsome 분획의 단백질 산화 : Rat의 간세포내 microsome 분획의 반응시간별 carbonyl group 함량의 변화는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 0.5시간부터 3시간째까지 유의성 있는 ($p < 0.05$) 차이를 보였는데, 가장 높은 증가를 보인 시간대와 그 함량은 vitamin E 비투여군의 경우 1.5시간째에 $0.3696 \pm 0.04 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보였으며, 투여군의 경우 4시간째에 $0.3024 \pm 0.042 \text{ nmol/mg protein}$ 을 보였다(Fig 6). 증가폭선을 비교했을 때 vitamin E 비투여군에서는 0.5시간부터 급격한 증가를 보였으나, 투여군에서는 1.5시간 이후부터 훨씬 낮은

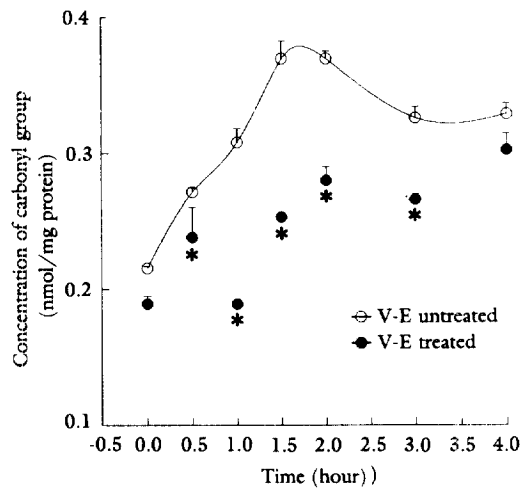


Fig 6. Comparison of the free-radical induced carbonyl group levels in vitamin E treated and untreated rat liver microsomes. The results are expressed as a mean \pm S.E. obtained from 3-5 tests. *: $p < 0.05$ compared with vitamin E untreated group.

증가치를 보였다.

고찰

생체의 노화나 발암, 전염병과 같은 현상들을 설명하고자 하는 여러 연구자들의 시도는 소모설과 유전자설로 대별되는 이론으로 정립되었으며, 그 중 세포의 생존능을 점차 잠식해가는 외부의 영향에 지속적으로 노출됨으로써 생체기능이 저하된다는 소모설이 근래에 와서 크게 인정되고 있다. 소모설중에서도 특히 free

radical 이론은 최근에 많은 연구자들의 관심이 집중되고 있는 이론으로 세포손상을 야기하는 반응성 radical이 생체의 기초 대사과정, 전이금속 등의 유도반응 및 여러가지 xenobiotics의 대사과정에서 생성되어 생체구성 성분과 결합함으로써 지방성분을 radical로 만들거나 다른 유해한 손상을 야기한다고 알려져 있다.^{22,23} 한편 free radical의 생성을 막거나 생성된 것을 소거하는 생체내 항산화제로서 superoxide dismutase, glutathion peroxidase 등의 지용성 저분자 화합물과 ascorbic acid, glutathion 등의 수용성 저분자 화합물 및 heme 합성의 중간산물인 protoporphyrine IX 등^{7,24,26}이 있으며 또한 식이성 항산화제인 selenium, mannitol 등^{27,28}이 있다. 이렇게 생체내에서 일어나는 free radical의 생성반응과 이를 억제하는 항산화능은 상호 균형을 이루고 있으며 질병과 기타 요인으로 이 균형이 상실될 때 산화적 손상이 유발된다는 것이다.^{7,14}

이 실험에서 사용된 항산화제인 vitamin E는 세포막에 주로 존재함으로써 지질, 단백질, hormone, 효소 등의 활성과 기타 생식기와 근육격체에 광범위한 작용을 하며, 특히 비효소계 반응으로 free radical을 소거하여 생체내 다불포화 지방산의 과산화화를 막는 항산화작용이 널리 알려져 있다.^{7,12,27,29-31}

이 실험에서 rat의 간균질액에 대해 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 지질과산화 반응에서는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 현저한 MDA 생성량의 감소를 보임으로써 vitamin E의 항산화효과를 나타내었다. 이는 Tappel et al¹³, Yoshioka et al¹⁵, Fukuzawa et al³⁵의 지질과산화에 따른 vitamin E의 항산화효과에 대한 보고와 일치하였다. 또한 그 증가폭을 비교했을 때 vitamin E 투여군에서는 0시간부터 4시간째까지 완만한 증가폭을 유지하였으나, vitamin E 비투여군에서는 0.5시간부터 급격한 폭으로 증가되었는데 이는 상대적으로 세포내에 적재된 vitamin E의 양이 많은 투여군에서 항산화작용이 오래 지속되었다는 것을 의미하며, 이 결과는 Dillard et al²⁸과 Di Luzio et al³⁰의 보고와 일치하는 것으로 볼 수 있다.

이 실험에서 rat의 간세포내 mitochondria 분획에 대해 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 지질과산화 반응에서는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 MDA 생성량이 현저하게 감소되었다. 또한 그 증가 폭을 비교했을 때 vitamin E 투여군에서는 0시간부터 3시간까지는 거의 수평곡선을 보이다가 4시간째부터 상승되었으나, 비투여군에서는 0시간부터 1시간 사이에 이미 최고치에 가까운 MDA 생성량에 도달되는 급격한 증가폭을 볼 수 있었는데 이는 vitamin E 투여군이 비투여

군에 비해서 적재된 vitamin E의 양이 많음으로 인해 항산화의 지속정도가 훨씬 큰 것으로 생각되며, 이 결과는 Grinna et al³⁷, Dean et al³³의 보고와 거의 일치하는 경향을 나타내었다.

한편 지질과산화 반응의 전형적 모델로 많이 이용되어져^{27,30,34,38}은 rat의 간세포내 microsome 분획에 대해 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 지질과산화 반응에서는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 0시간에서 1.5시간까지는 현저하게 낮은 MDA함량을 보이다가 그 이후부터는 다소 미약한 차이를 보임으로써 microsome 분획내에서의 vitamin E의 항산화작용이 간 균질액이나 간세포내 mitochondria 분획내에서의 vitamin E의 항산화작용보다 MDA 생성을 억제한 양이나 억제 지속시간을 고려할 때 상대적으로 약한 것으로 생각된다.

위의 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 지질과산화에 대한 간 균질액과 간세포내 mitochondria 및 microsome 분획에서 vitamin E의 작용에 대한 평가 결과를 조합해 보면, 첫째, vitamin E 비처리군에서의 지질과산화 정도는 간 균질액과 간세포내 microsome 분획이 mitochondria 분획보다 더 크게 나타났다. 이 결과는 간세포내 microsome의 막내에 지질과산화에 민감한 다불포화 지방산이 상대적으로 많다는 점¹²을 고려할 때 microsome에 대한 결과가 다소 낮게 나왔거나 간 균질액의 결과가 다소 높게 나온 것이라 생각된다. 둘째, vitamin E 처리군에서의 지질과산화 정도를 비교했을 때 microsome 분획이 가장 크게 나타났고, mitochondria 분획과 간 균질액의 결과는 거의 비슷하였다. 이 결과들은 간세포내에서 vitamin E의 항산화효과가 mitochondria나 microsome 분획 이외의 다른 소기관에서 더 크게 나타날 가능성을 보여 준 것이라 생각된다. 셋째, MDA 생성량의 증가폭선의 양상을 비교했을 때 간 균질액의 경우 vitamin E의 항산화효과가 4시간 이상 지속된다는 증거를 보였으며, 간세포내 mitochondria 분획의 경우 Dean et al³³의 보고와 같이 4시간째가 vitamin E의 완전고갈상태라고 생각된다. 간세포내 microsome 분획의 경우 항산화효과의 지속시간이 훨씬 낮은 1.5시간으로 나타났으며 2시간 이후부터는 vitamin E가 완전고갈상태에 도달한 것으로 생각된다.

Free radical 반응과 관련하여 생겨나는 체내 유해대사물 중 단백질이나 다른 생물학적 화합물에 공유결합함으로써 작용하는 aldehyde화합물에 대해 많이 알려져 있으며^{39,43} 이러한 carbonyl group의 생성은 단백질의 손상 및 이로 인한 세포의 손상 등과 관련된다고 보고되었다.^{44,52}

이 실험에서 rat의 간균질액에 대해 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 free radical 반응에 따른 단백질 산화의 평가에서는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 carbonyl group 생성량이 감소되었으며 특히 0.5, 1.5 및 4시간째에 큰 차이를 보였다. 그러나 MDA의 생성량과 비교했을 때 보다는 미약한 차이였다. Carbonyl group 생성량의 증가곡선을 비교했을 때 vitamin E 투여군에서는 3시간째까지는 큰 증가폭이 없는 양상을 유지하다가 4시간째부터 다소 급격하게 증가되었으며, vitamin E 비투여군에서는 0.5시간과 1시간째까지는 거의 증가되지 않다가 1.5시간째부터 급격한 폭으로 증가되었다. 이는 vitamin E의 투여가 간 균질액내 단백질의 산화로 인한 carbonyl group의 생성을 억제 및 지연시킨 것으로 생각되며 Dean et al³³이 간세포내 mitochondria 분획내에서 Cu²⁺를 사용하여 유도한 단백질산화에서의 보고와 그 양상이 유사하였다.

이 실험에서 간세포내 mitochondria 분획에 대해 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 free radical 반응에 따른 단백질산화의 평가에서는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 0시간에서 3시간째까지는 carbonyl group 생성량의 차이가 크게 없었으나, 4시간째에 이르렀을때 vitamin E 비투여군에서는 급격한 증가치를 보였다. 이는 mitochondria 분획내의 항산화능이 vitamin E 비투여군에서도 오래 지속되었다는 것과 4시간째의 차이는 vitamin E 투여군에서의 항산화효과의 지속 및 그 정도가 더 크기 때문이라고 생각되며 이러한 결과는 Dean et al³³의 보고와 거의 일치하였다.

이 실험에서 간세포내 microsome 분획에 대해 FeCl₃와 ascorbic acid로 유도된 free radical 반응에 따른 단백질산화의 평가에서는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비해 carbonyl group 함량의 현저한 감소를 보임으로써 vitamin E의 항산화 효과를 나타내었다. Carbonyl group 생성량의 증가곡선을 비교했을 때 vitamin E 비투여군에서는 0.5시간째부터 급격하게 증가하여 1.5시간 이후부터는 거의 평형상태를 지속하였으나 vitamin E 투여군에서는 훨씬 완만한 기울기로 수평곡선과 상승곡선을 반복하였다.

위의 FeCl₃와 ascorbic acid로 간 균질액과 간세포내 mitochondria 및 microsome 분획내에서 유도된 단백질 산화에 대한 vitamin E의 작용을 종합해 보면 첫째, vitamin E 비투여군에서의 단백질산화 정도는 mitochondria 분획이 가장 높았고 그 다음으로는 microsome 분획, 간균질액 순으로 나타났다. 둘째, vitamin E 처리군에서의 단백질산화 정도를 비교했을

때 mitochondria 및 microsome 분획이 간 균질액의 경우보다 높았다. 셋째, carbonyl group 함량의 증가곡선의 양상을 비교했을 때 MDA 함량의 증가곡선과는 달리 4시간째가 아닌 1.5시간부터 3시간 사이에서 최고치를 나타내었으며 증가정도도 현저히 낮았다.

지금까지 논의된 바와 같이 FeCl₃와 ascorbic acid 유도의 지질과산화 및 단백질산화의 초기단계에서 vitamin E가 억제작용을 함으로서 rat의 간 균질액, 간세포내 mitochondria와 microsome 분획의 산화적 손상을 지연시킨다는 것을 확인하였다. Vitamin E의 투여에 의한 지질 과산화의 억제지속시간은 간 균질액이 가장 길었고 다음으로 mitochondria, microsome 분획순으로 나타났으며, 단백질산화의 억제 지속시간은 mitochondria 분획이 가장 길었고 다음으로 간균질액, microsome 분획순으로 나타났다. 그래서 간세포내에서의 vitamin E의 적재정도는 microsome 분획이 다른 소기관보다 작은 것으로 생각되었다. 그리고 vitamin E에 의한 산화적 손상의 억제정도가 단백질보다는 지질에서 더욱 크게 나타났다.

이러한 결과들을 통해 vitamin E의 간세포내 대사추이 및 항산화능의 차이를 파악할 수 있었다.

이 실험에서의 결과나 논의된 점들은 앞으로 확증을 위해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용한 잔류항산화제의 정량^{46,59}과 보다 근원적인 접근을 위해 방사선 동위원소를 이용한 유전정보 및 대사의 흐름상에서 일어난 변이에 대한 연구^{9,11}등이 행해져야 할 것으로 생각된다.

결론

이 실험은 철(FeCl₃)과 ascorbic acid로 유도된 free radical 반응에 따른 세포내 지질 및 단백질의 산화적 손상에 대한 vitamin E의 억제효과를 알아 보기 위하여 수행되었다.

SPF rat(Sprague-Dawley)를 이용한 실험에서 *dl*-α-tocopheryl acetate를 체중 kg당 100mg 주사한 투여군과 동량의 corn oil을 주사한 비투여군에서 간 균질액 및 간세포내 mitochondria와 microsome 분획에 대하여 MDA와 carbonyl group 함량조사를 시간별로 행하였다.

실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Rat의 간세포내 지질과산화 정도는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비하여 간 균질액에서는 1시간부터 4시간 사이에서 유의성 있는(p<0.05) 감소치를 보였고,

간세포내 mitochondria 분획에서는 1시간째를 제외한 모든 시간대에서 유의성 있는($p<0.05$) 감소치를 보였다. 또한 간세포내 microsome 분획에서도 0.5시간부터 3시간 사이에서 유의성 있는($p<0.05$) 감소치를 보였다.

2. Rat의 간세포내 단백질산화 정도는 vitamin E 투여군이 비투여군에 비하여 간 균질액에서는 1.5시간과 4시간째에서 유의성 있는($p<0.05$) 감소치를 보였고, 간세포내 mitochondria분획에서는 4시간 이후에 유의성 있는($p<0.05$) 감소치를 보였다. 또한 간세포내 microsome 분획에서는 0.5시간에서 3시간 사이에서 유의성 있는($p<0.05$) 감소치를 보였다.

참 고 문 헌

- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J Bio Chem* 1991; 266:2005-2008.
- Livine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-478.
- Scott MT. Advances in our understanding of vitamin-E. *Fed Proc* 1980; 39:2736-2739.
- Tappel AT. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 1973; 32(8):1870-1874.
- Halliwell B. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed, Clarendon. Oxford 1989; pp:10-21.
- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.
- 정해영. 활성산소, 암, 노화, 의학종설 1991; 2(4): 25-53.
- Plaa GL, Witschi H. Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Annu. Rev Pham Toxicol*, 1976; 16: 125-141.
- Summerfield FW, Tappel AL. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E or aging and peroxidative damage to DNA. *Arch Biochem* 1984; 233(2):408-416.
- Davis KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J Bio Chem* 1987; 262(20):9895-9901.
- Pierce RA, Glaug MR, Greco RS et al. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem* 1987; 262(4):1652-1658.
- Tappel AL. Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. *Ana NY Acad Sci* 1980; 355:18-31.
- Tappel AL. Biological antioxidant protection against lipid peroxidation damage. *Am J Clin Nutr*, 1970; 23(8):1137-1139.
- 정명희, 산소는 언제나 유익한 것인가. *의학종설* 1990; 1(2):24-41.
- Yoshioka T, Motoyama H, Yamasaki F et al. Protective effect of vitamin E against lipoperoxides in developing rats. *Biol Neonate* 1987; 51:170-176.
- Murphy ME, Kehrer JP. Lipid peroxidation inhibitory factors in liver and muscle of rat, mouse and chicken. *Arch Biochem Biophys* 1989; 268(2):585-593.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O et al. *Adv Free Radicals Biol Med* 1986; 2:419-444.
- Frei B, England L, Ames BN et al. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6377-6381.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1978; 95:351-358.
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Song CS, Lee TC. Effect of chemical inactivants on viral polypeptide of newcastle disease virus. *Res Rept RDA(V)* 1988; 30(3):77-89.
- Hunt JV, Dean RT, Free radical-mediated degradation of protein: The protective and deteriorious effects of membrans. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 162: 1076-1084.
- Comporti M, Biophy of disease:lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury, *Lab Invest* 1985; 53(6):599-623.
- Leung HW, Vang MJ, Mavis RD. The cooperative interaction between Vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochem Biophys Acta* 1981; 664:266-272.
- Imai K, Aimoto T, Sato M et al. Antioxidative effect of protoporphyrin on lipid peroxidation in rat liver subcellular fraction. *Chem Pharm Bull* 1988; 36(3):1104-1109.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, *J Biol Chem* 1969; 244(22):6049-6055.
- Jr Combs GF, Noguchi T, Scott ML. Mechanisms

- of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Fed Proc* 1975; 34(11): 2090-2095.
28. Dillard CJ, Kunert KJ, Tappel AL. Effects of vitamin E, ascorbic acid and mannitol on alloxan-induced lipid peroxidation in rats. *Arch Biochem Biophys* 1982; 216(1):204-212.
 29. Pasco GA, Olafsdottir K, Reed DJ, Vitamin E protection against chemical-induced cell injury; 1. Maintenance of cellular protein thiols as a cytoprotective mechanism. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256(1):150-158.
 30. Ham YA, Hong YS, Sung NE. The effect of vitamin antioxidants on lipid peroxidation in rat microsomes. *Ewha Med J* 1982; 5:109-116.
 31. Machlin LJ. *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker inc, New York, 1984; 99-145.
 32. Grand DK. Membranes: structure, assembly and function. Murray RK, Granner DK, Mayes PA et al ed: *Harper's Biochemistry*. Connecticut: Appleton and Lange 1988; 445-462.
 33. Dean RT, Cheeseman KH. Vitamin E protects against free radical damage in lipid environments. *Biochem Biophys Res Com* 1987; 148(3):1277-1282.
 34. Kornbrust DJ, Mavis RD. Microsomal lipid peroxidation :1. Characterization of the role of Iron and NADPH. *Mol Pharmacol* 1979; 17:400-407.
 35. Fukuzawa K, Takase S, Tsukatani H. The effect of concentration on the antioxidant effectiveness of *α-tocopherol* in lipid peroxidation induced by superoxide free radicals. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240(1):117-120.
 36. Di Luzio NR. Antioxidants, lipid peroxidation and chemical induced liver injury. *Fed Proc* 1973; 32: 1875-1881.
 37. Grinna LS. Effect of Dietary *α-tocopherol* on liver microsomes and mitochondria of aging rats. *J Nutr* 1976; 106:918-929
 38. Murray M. In vitro and in vivo studies of the effect of vitamin E on microsomal cytochrome P450 in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1991; 42(11):2107-2114
 39. Bertone G, Dianzani MU. Inhibition by aldehydes as a possible further mechanism for glucose-6-phosphatase inactivation during CCl₄-poisoning. *Chem Biol Interact* 1977; 19:91.
 40. Brooks BR, Klammer OL. Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur J Biochem* 1968; 5:178.
 41. Kwon TW, Menzel DB, Olcott HS. Reactivity of malondialdehyde with food constituents. *J Food Sci* 1965; 30:808.
 42. Schauenstein E, Esterbauer H. Formation and properties of reactive aldehydes. In *Submolecular biology and cancer*, Ciba foundation serise 67 Amsterdam:Excerpta Medica. 1979; 225.
 43. Shin BC, Huggins JW, Carraway KL. Effects of pH, concentration and aging on the malondialdehyde reaction with proteins. *Lipids* 1972; 7:229.
 44. Lowrey K, Glende EA, Jr Recknagel RO. Destruction of liver microsomal calcium pump activity by carbon tetrachloride and bromotrichloromethane. *Biochem Pharmacol* 1981; 30:135.
 45. Lowrey K, Glende EA, Jr Recknagel RO. Rapid depression of rat liver microsomal calcium pump activity after administration of carbon tetrachloride or bromotrichloromethane and lack of effect after ethanol. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 59:389.
 46. Moore L. Inhibition of liver microsome calcium pump by in vivo administration of CCl₄, CHCl₃, and 1,1-dichloro-ethylene (vinylidenechloride). *Biochem Pharmacol* 1980; 29:2505.
 47. Paradisi L, Panagini C, Parola M et al. Effects of 4-hydroxynonenal adenylate cyclase and 5' nucleotidase activities in rat liver plasma membranes. *Chem Biol interact* 1985; 53:209.
 48. Curzio M, Torielli MV, Giraud JP et al. Neutrophil chemotactic response to aldehydes. *Res Com Chem Pathol Pharmacol* 1982; 36:463.
 49. Benedetti A, Barbieri L, Ferrali M et al. Inhibition of protein synthesis by carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Chem Biol Interact* 1981; 35:331.
 50. Benedetti A, Casini AF, Ferrali M et al. Cytotoxic effects of carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of microsomal lipids. In: Slater TF, Garner Aed, *Recent advances in lipid peroxidation and tissue injury*, Uxbridge: Brunel printing Oservices 1981; 56.
 51. Casini AF, Benedetti A, Ferrali M et al. Effetto Citotossicodici composti carbonilici(4-idrossialchenali) derivati dalla perossidazione dei lipidi microsomaliepatici sugli

- epatociti isolati. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1981; 57 : 1470.
52. 안봉환, 단백질의 Carbonyl 기 함량측정, 생물활성 연구법 1990; 557-569.
53. Corongiu FP, Vargiolu S, Milia A et al. Antioxidant and lipid peroxidation : "In vivo" studies. *Biochem Pharmacol* 1985; 34(3):397-398.
54. Horwitt MK. Vitamin and lipid metabolism in Man. *Am J Clin Nutr* 1960; 8:451-461.
55. Witting LA. Vitamin E-polyunsaturated lipid relationship in diet and tissues. *Am J Clin Nutr* 1974; 27:952-959.
56. Pratt OE, Rooprai HK, Show GK et al. The genesis of alcoholic brain tissue injury. *Alcohol Alcohol* 1990; 25(2/3):217-230.
57. Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Ethanol induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol* 1990; 25(2/3): 231-237.
58. Lohmann W, Neubacher H. Stable tissue free radicals. *Methods Enzymol* 1984; 105:451-456.
59. 박동기, Lipid peroxidation과 Aging, 생물활성연구법, 1991; 571-583.
-