

## 식이 Vitamin E가 Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 간 및 폐조직에서의 Microsomal Mixed Function Oxidase System에 미치는 영향

박영란 · 이순재<sup>†</sup> · 임영숙\* · 주길재\*\*

대구효성가톨릭대학교 식품영양학과

\*대구공업전문대학 식품영양과

\*\*경북대학교 농화학과

## Effect of Dietary Vitamin E on the Microsomal Mixed Function Oxidase System of Liver and Lung in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Young-Ran Park, Soon-Jae Rhee<sup>†</sup>, Young-Suk Lim\* and Gil-Jae Joo\*\*

Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan 713-702, Korea

\*Dept. of Food Science and Nutrition, Taegu Technical College, Taegu 704-350, Korea

\*\*Dept. of Agricultural Chemistry, Kyung-Pook National University, Taegu 702-701, Korea

### Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of dietary vitamin E on microsomal mixed function oxidase system of liver and lung in streptozotocin(STZ) induced diabetic rats. Sprague-Dawley male rats weighing  $140 \pm 10$ mg were randomly assigned to one control and three STZ-diabetic groups. Diabetic groups were divided into DM-0E(vitamin E free diet), DM-40E(40mg vitamin E kg/diet) and DM-400E(400mg vitamin E kg/diet) according to the level of vitamin E supplementation. Diabetes was experimentally induced by intravenous administration of 55mg/kg b.w of STZ in citrate buffer(pH 4.3) after 4 week feeding of three experimental diets. Animals were sacrificed at the 6th day of diabetic state. The contents of cytochrome P<sub>450</sub> in DM-0E, DM-40E and DM-400E groups of liver were increased by 162%, 150% and 56%, respectively, compared with that of control. Also the contents of cytochrome P<sub>450</sub> in lung were similar to liver. The activities of cytochrome b<sub>5</sub> in DM-0E and DM-40E groups of the liver were increased by 70% and 53%, respectively, compared with that of control, but not in DM-400E group. The activities of b<sub>5</sub> in DM-0E, DM-40E and DM-400E groups of lung were significantly increased. Activity of cytochrome P<sub>450</sub> reductase in DM-0E, DM-40E of liver and lung were higher than that of control group, but the activity of DM-400E group was not different from that of control. The lipid peroxide values of DM-0E, DM-40E and DM-400E groups were 143%, 95% and 31% higher than those of control. It was concluded that dietary vitamin E had protective effects on lipid peroxidation accompanied with increased mixed function of oxidase activity in diabetic rats.

**Key words:** diabetes, mixed function oxidase system, vitamin E

### 서론

지질과산화는 free radical 제거계의 활성이 저하되거나 free radical 생성계의 촉진으로 인해 이들간의 균형이 깨어졌을 때 일어나며 그로인해 조직은 과산화적 손상을 입게 되어 노화나 염증반응 및 성인병을 촉진하고, 나아가 암과 같은 퇴행성질환이 유발케 된다(1,2). 전보(3)에서 당뇨병에서는 특히 이러한 free radical생

성계로 알려진 microsomal mixed function oxidase계(MFO계)가 활성화됨을 관찰한 바 있다. MFO계는 간에서 2상의 해독과정중 제1상에 관여하는 효소계이다(4). 즉 생체내에 흡수되는 환경오염 물질, 약물 등과 같은 지용성 이물질들은 산화, 환원, 결합 등의 변형과 해독 과정을 통해 수용성으로 전환되어 체외로 배설되거나, 약물이 불활성화되며, 여기에 관여하는 약물대사 및 기타 독성물질의 대사는 크게 2상 반응으로 나누어진

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

본 연구는 대구효성가톨릭대학교의 연구비에 의하여 연구되었음.

다고 알려져 있다(4,5).

1상 과정에서는 약물 및 독성물질 등 지용성 물질을 산화, 환원, 가수분해를 통하여 2상에서 처리되기 쉽게 만들며, 2상에서는 UDP-glucuronic acid, glutathione, sulfate 등과 결합시켜 수용성을 증가시키므로써 배설을 용이하게 한다(6).

1상 변형과정에 관여하는 효소로는 간세포의 소포체막에 지방산, steroid 등의 내인성 물질과 약물이나 발암물질 등 외부로부터 유입된 물질들을 대사시키는 cytochrome P<sub>450</sub> 의존성 MFO계란 일련의 전자전달계 효소군이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 효소계는 membrane bound enzyme들인 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub>, NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 등으로 구성되어 있으며, cytochrome P<sub>450</sub>에 의하여 촉매되는 이 산화반응에서 산소분자 중의 하나만 기질에 이용되고 다른 하나는 H<sub>2</sub>O로 환원되기 때문에 MFO 또는 monooxygenase reaction이라 한다(7). MFO계에 의한 생성물질은 대부분 생물학적으로 비활성이므로 이 효소계는 체내에서 매우 중요한 해독기전이라 생각된다.

그러나 많은 약물이나 독소, 발암물질 등이 cytochrome P<sub>450</sub> 촉매에 의한 변형 과정 동안 활성화되어 원래의 물질보다 더 활성적인 물질이 되기도 한다. 또 MFO 효소계는 독성물질을 해독하는 과정에서 O<sub>2</sub> 나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성이 가능하고 조직에는 과산화반응이 초래될 수 있다(8).

MFO계의 활성변화는 기질이 다양하고 나이나 영양상태 등의 여러가지 생체 조건에 따라 달라진다는 여러 보고(9,10)가 있고 그외에도 MFO계 활성에 미치는 항산화제에 관한 연구도 다소 보고(11-13)되고 있다.

그러나 당뇨병 상태에서의 MFO계의 활성변화에 따른 지질과산화의 축적과 이에 미치는 항산화제와의 관련연구는 없었다. 그러므로 본 연구에서는 streptozotocin 유발 당뇨병에 있어서의 MFO계 활성 변화와 이에 따른 지질과산화를 간장과 췌조직에서 관찰하고 아울러 이들에 미치는 식이 vitamin E의 영향을 관찰코져 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 식이

실험동물은 체중 140g 내외의 Sprague-Dawley종 수컷을 사용하였으며, 환경에 적응시키기 위해 일주일간 예비 사육한 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 Table 1과 같이 당뇨를 유발하지 않은 대조군(40mg vitamin E/kg diet)과 당뇨유발 실험군으로 나눈 후 실험군을 다시 식이내 비타민 공급 수준

에 따라 비타민 E를 공급하지 않는 DM-0E군(0mg vitamin E/kg diet), vitamin E를 정상적 수준으로 공급한 DM-40E군(40mg vitamin E/kg diet), 비타민 E를 다량 공급한 DM-400E군(400mg vitamin E/kg diet) 등 각 10마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다.

기본 실험 식이조성은 Table 2와 같으며 매일 일정 시간에 공급하여 자유로이 섭취케 했다. 당뇨 유발은 당뇨 유발군 동물을 희생시키기 6일 전에 streptozotocin

Table 1. Classification of experimental groups

Groups	Vitamine E <sup>1)</sup> (mg/kg diet)	STZ injection <sup>2)</sup>
Control	40mg	-
STZ-diabetic		
DM- 0E	0mg	+
DM- 40E	40mg	+
DM-400E	400mg	+

<sup>1)</sup>DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate

<sup>2)</sup>Intravenous injection of streptozotocin(55mg/kg of body weight) in citrate buffer(pH 4.3) via tail vein  
Control: 40mg of vitamin E/kg diet, DM-0E: 0mg of vitamin E/kg diet, DM-40E: 40mg of vitamin E/kg diet, DM-400E: 400mg of vitamin E/kg diet

Table 2. Composition of basal diet

Ingredients	Basal diet(g/kg diet)
Corn starch <sup>1)</sup>	668
Casein <sup>2)</sup>	180
DL-methione <sup>3)</sup>	2
Corn oil <sup>4)</sup>	50
Vitamin E mix <sup>5)</sup>	10
Salt mix <sup>6)</sup>	40
Cellulose <sup>7)</sup>	50
kcal/kg	3.850

<sup>1)</sup>Pung jin Chem. Co.

<sup>2)</sup>Lactic casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wington, N. Z.

<sup>3)</sup>Sigma Chem. Co.

<sup>4)</sup>Dong Bang Oil Co.

<sup>5)</sup>Salt mix: according to Haper's(14)

g per/100g of salt mixture; CaCO<sub>3</sub>, 30.0g; CaHPO<sub>4</sub>, 7.5g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 32.2g; NaCl, 16.7g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10.2g; ferrictrate, 2.75g; MnSO<sub>4</sub>, 0.51g; KI, 70mg; CuCl<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 35mg; ZnCl<sub>2</sub>, 25mg; CoCl<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 5mg; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 5mg

<sup>6)</sup>Vitamin E free mix: according to NRC<sup>14)</sup>

per kg of diet; thiamin-HCl, 20mg; riboflavin, 21mg; pyridoxine, 20mg; nicotinic acid, 90mg; d-calcium pantothenate, 60mg; folic acid, 10mg; biotin, 1mg; menadione, 45mg; vitamin B<sub>12</sub>(0.1% triturate in mannitol), 20mg; retinyl acetate, 2,000IU; cholecalciferol, 1,000IU; choline, 1.5g; inositol, 0.1g; p-amino benzoic acid, 0.1g

<sup>7)</sup>Sigma Chem. Co.

CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber)

(STZ)를 55mg/kg body weight을 신선한 0.1M citrate buffer(pH 4.3)에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. STZ를 주사한 후 6일째 혈당량이 300mg/dl 이상인 동물만 실험에 사용하였다.

#### 체중 증가 및 식이효율

체중은 전 실험기간을 통하여 이틀에 한번씩 일정한 시간에 측정하였으며 식이효율은 전 체중 증가량을 같은 기간 동안의 식이 섭취량을 나누어 줌으로써 계산하였다.

#### 시료채취 및 효소원의 조제

실험 종료 후 12시간 절식시킨 후 쥐를 희생시켰다. 간장과 폐를 절제하고 0.9% NaCl로 세척한 후 액체 질소로 급속 냉동시킨 후 -80°C에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다.

간장과 폐조직의 microsome 분획은 0.25M sucrose로 일정량의 간조직을 균질화시킨 후 8,000×g에서 4분간 원심분리하였다. 이때 얻어진 상층액을 다시 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 상층액인 cytosol 분획과 침전물(pellet)와 microsome 분획을 분리한다. 다시 pellet 층에 0.25M sucrose를 3ml 넣어 105,000×g에서 60분간 원심분리한 후 pellet에 0.25M sucrose로 부유시켜 -80°C에서 보관하였다가 본 실험에 사용하였다.

#### 간조직과 폐조직 중의 cytochrome P<sub>450</sub> 활성 측정

간 및 폐조직 microsome 중의 cytochrome P<sub>450</sub> 함량은 Omura와 Sato(15)의 방법으로 환원형 일산화탄소 결합물을 450nm와 490nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 즉 냉동 보관한 microsome용액을 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)로 희석시켜 1mg/ml의 단백질 농도로 만든 다음 sodium dithionite를 넣고 CO gas로 bubbling시킨 후 450nm와 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때의 molar extinction coefficient는 91mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 하였다.

#### 간조직과 폐조직 중의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량

Omura와 Sato(15)의 방법으로 cytochrome b<sub>5</sub>의 환원형과 산화형 사이의 흡광도를 측정하였다. 보관된 microsome용액을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 희석시킨 다음 NADH용액을 넣어 NADH 최종 농도가 0.2mM이 되도록 한 다음 424nm와 409nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때의 molar extinction coefficient는 185mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 하였다.

#### 간조직과 폐조직 중의 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성 측정

Master 등의 방법(16)으로 dichlorophenolindophenol (DCIP)의 흡광도 감소를 600nm에서 1분간 관찰하여 활성도를 측정하였다. 보관된 microsome용액을 0.05M phosphate buffer(pH 7.7, 10<sup>-4</sup>M EDTA 포함)로 희석시켜 1mg/ml의 단백질 농도로 만든 다음 semimicro cell 내에 희석용액이 DCIP 96×10<sup>-9</sup>moles이 함유되도록 하고 10<sup>-3</sup>M NADPH용액을 가하여 최종 부피가 1.1ml 되도록 하고 이때 NADPH용액을 넣은 후 30°C에서 1분간 흡광도의 감소를 측정하였고 molar extinction coefficient는 21mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 하였다.

#### 간조직과 폐조직 중의 지질과산화물 함량 측정

조직의 과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 물질을 n-butanol로 추출하는 Satoh(17) 방법을 이용하였다.

#### 단백질 측정

간과 폐조직의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry방법(18)에 의해 측정하였다.

#### 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 Tukey's HSD test에 의해 처리하였다.

### 결과 및 고찰

#### 체중증가, 식이 섭취량 및 식이 효율

실험 4주간 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 실험기간 동안 체중 변화를 관찰한 결과(Table 3) streptozotocin(STZ)을 투여하기 전까지는 대조군에 비해 DM-0E군만 낮았으나 STZ를 투여한 후 DM군 모두 감소하였다.

실험군간의 체중 변화를 비교해 보면 DM-400E군이 DM-0E, DM-40E군에 비해 감소량이 적었다.

식이 섭취량도 STZ 투여 전에 실험군간에 차이가 없었으나 투여 후에는 DM-0E군이 낮았다. 식이효율도 STZ 투여 전에는 DM-0E군만 낮았으나 STZ 투여 후에는 STZ군 모두 감소하였으며 그 중에서도 DM-0E군이 가장 낮았다.

**Table 3. Body weight gain, food intake, and food efficiency ratio of rats**

Groups	Body weight gain(g/4wks)		Food intake(g/4wks)		FER	
	Before STZ injection					
Control	120.0 ± 0.21 <sup>a</sup>		322.73 ± 14.15 <sup>NS</sup>		0.372 ± 0.045 <sup>a</sup>	
STZ-diabetic						
DM- 0E	85.0 ± 7.14 <sup>b</sup>		369.75 ± 17.25		0.230 ± 0.032 <sup>b</sup>	
DM- 40E	115.0 ± 9.52 <sup>a</sup>		306.01 ± 22.60		0.376 ± 0.043 <sup>a</sup>	
DM-400E	100.0 ± 6.17 <sup>a</sup>		330.81 ± 19.35		0.302 ± 0.039 <sup>ab</sup>	
After STZ injection(g/6days)						
Control	20.0 ± 1.15 <sup>a</sup>		80.82 ± 14.35 <sup>a</sup>		0.248 ± 0.018 <sup>a</sup>	
STZ-diabetic						
DM- 0E	-50.0 ± -4.37 <sup>b</sup>		38.35 ± 1.65 <sup>b</sup>		-1.304 ± -0.123 <sup>b</sup>	
DM- 40E	-65.0 ± -5.24 <sup>b</sup>		71.46 ± 9.70 <sup>a</sup>		-0.910 ± -0.088 <sup>c</sup>	
DM-400E	-35.0 ± -2.10 <sup>c</sup>		72.30 ± 5.45 <sup>a</sup>		-0.484 ± -0.050 <sup>c</sup>	

All values are mean ± SE(n=10)

Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

<sup>NS</sup>Not significant

**Table 4. Liver and lung weights of experimental rats**

Groups tissue	Liver weight (g/100g B.W.)	Lung weight (g/100g B.W.)
Control	3.449 ± 0.064 <sup>a</sup>	0.631 ± 0.060 <sup>NS</sup>
STZ-diabetic		
DM- 0E	3.145 ± 0.126 <sup>b</sup>	0.538 ± 0.021
DM- 40E	3.324 ± 0.080 <sup>ab</sup>	0.604 ± 0.038
DM-400E	3.329 ± 0.180 <sup>ab</sup>	0.627 ± 0.043

All values are mean ± SE(n=10)

Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

<sup>NS</sup>Not significant

#### 각 조직의 무게

간 및 폐조직의 무게는 Table 4와 같다. 체중 100g당 간장의 무게는 대조군에 비해 DM-0E군만 감소하였고 DM-40E, DM-400E는 유의성이 없었다. 폐조직의 무게는 대조군에 비해 DM군간의 유의적인 차가 없었다.

#### 간조직 및 폐조직의 cytochrome P<sub>450</sub> 측정

간조직 중의 cytochrome P<sub>450</sub> 함량은 Table 5와 같다. Cytochrome P<sub>450</sub>은 대조군에 비해 DM-0E, DM-40E, DM-400E에서 각각 162%, 150%, 56%씩 증가하였다. 비타민 E의 영향을 관찰한 결과 비타민을 다량 투여한 DM-400E군은 DM-0E 및 DM-40E군 보다 각각 37% 및 39%씩 감소하였다. 이와 같이 식이내 vitamin E 공급수준에 따라 간조직 중의 cytochrome P<sub>450</sub> 함량이 감소하였다.

폐조직에서의 cytochrome P<sub>450</sub> 함량은 Table 5에서와 같이 간조직에서 보다 그 함량은 낮았지만 경향은 비슷하였다.

**Table 5. Effect of vitamin E on microsomal cytochrome P<sub>450</sub> contents in liver and lung of STZ-induced diabetic rats**

Groups tissue	Liver (nmol/mg protein)		Lung (nmol/mg protein)	
	Control	0.141 ± 0.016 <sup>a</sup>		0.083 ± 0.015 <sup>a</sup>
DM- 0E	0.370 ± 0.012 <sup>b</sup>		0.203 ± 0.009 <sup>b</sup>	
DM- 40E	0.353 ± 0.043 <sup>b</sup>		0.211 ± 0.010 <sup>b</sup>	
DM-400E	0.220 ± 0.019 <sup>c</sup>		0.129 ± 0.007 <sup>c</sup>	

All values are mean ± SE(n=10)

Values with different from superscript letters are significantly different from other groups(p<0.05)

**Table 6. Effect of vitamin E on microsomal cytochrome b<sub>5</sub> contents in liver and lung of STZ-induced diabetic rats**

Groups tissue	Liver (nmol/mg protein)		Lung (nmol/mg protein)	
	Control	0.163 ± 0.012 <sup>a</sup>		0.118 ± 0.010 <sup>a</sup>
STZ-diabetic				
DM- 0E	0.277 ± 0.015 <sup>b</sup>		0.294 ± 0.020 <sup>b</sup>	
DM- 40E	0.250 ± 0.004 <sup>b</sup>		0.255 ± 0.020 <sup>b</sup>	
DM-400E	0.182 ± 0.009 <sup>a</sup>		0.177 ± 0.010 <sup>c</sup>	

All values are mean ± SE(n=10)

Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test

#### 간조직 및 폐조직의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량

간조직과 폐조직에서의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 Table 6과 같다.

간조직에서 cytochrome b<sub>5</sub>은 대조군에 비해 비타민 E가 결핍된 군인 DM-0E군과 정상적으로 공급한 DM-40E군은 증가하였으나, DM-400E군은 대조군 수준이었다.

폐조직에서는 대조군에 비해 DM-0E, DM-40E 및 DM-400E군은 각각 149%, 116%, 50%씩 증가하였고, 또 DM-400E군은 DM-0E군, DM-40E군에 비해 각각 40% 및 31%씩 낮았다.

**간조직 및 폐 조직의 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성**

간 및 폐조직의 cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성은 Table 7과 같다. 간조직에서 cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성은 대조군에 비해 DM-0E군은 58% 증가하였고 DM-40E군은 47% 증가하였으나, DM-400E는 대조군 수준이었다. 폐조직에서도 그 경향이 비슷하였다.

**간조직과 폐조직의 지질과산화물**

생체조직의 과산화적 손상의 지표로 알려진 지질과산화물을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 간조직 지질과산화는 대조군에 비해 DM-0E군은 143% 높았고, DM-40E군은 95% 높았으나 비타민 E를 다량 투여한 DM-400E군에서는 31% 정도 높았다. 폐조직에서는 대조군에 비해 DM-0E군 및 DM-40E군, DM-400E는 각각 107%, 73%, 38%씩 증가하였다. 이는 간조직에서와 경향은 비슷했으나 지질과산화적 손상이 다소 높았다. 따라서 당뇨유발식이 중 비타민 E의 수준에 따라 조직의 과산화적 손상이 완화되었다.

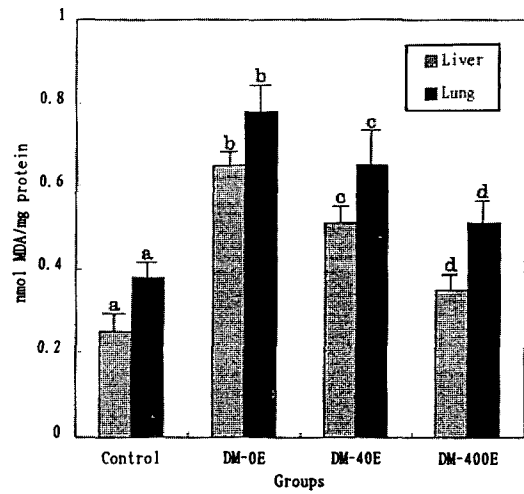
본 연구는 STZ 유발 당뇨쥐의 간조직 및 폐조직에서의 microsomal MFO계 및 과산화적 손상과 이에 미치는 비타민 E의 영향을 관찰하기 위하여 간조직과 폐조직에서의 약물대사 효소계 활성을 보고 이러한 변화가 지질과산화 반응에 어떠한 영향을 주는지를 검토하였다.

제1상 약물대사 효소계에서 가장 중심이 되는 cytochrome P<sub>450</sub>은 간조직에서 대조군에 비해 DM-0E, DM-40E 및 DM-400E군이 각각 163%, 150%, 56% 증가하

**Table 7. Effect of vitamin E on microsomal NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase activity in liver and lung of STZ-induced diabetic rats**

Groups tissue	Liver(nmol/mg protein/min)	Lung(nmol/mg protein/min)
Control	23.47 ± 2.941 <sup>a</sup>	26.47 ± 1.634 <sup>a</sup>
STZ-diabetic		
DM- 0E	37.11 ± 2.430 <sup>b</sup>	42.23 ± 3.260 <sup>b</sup>
DM- 40E	34.47 ± 1.211 <sup>b</sup>	46.22 ± 2.458 <sup>b</sup>
DM-400E	26.12 ± 1.500 <sup>a</sup>	28.50 ± 1.667 <sup>a</sup>

All values are mean ± SE(n=10)  
Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test



**Fig. 1. Effects of vitamin E on microsomal lipid peroxide values in liver and lung of STZ-induced diabetic rat.**

All values are mean ± SE(n=10).  
Values with different from superscript letters are significantly different from other groups(p<0.05).

였는데 이는 발암물질을 투여한 군에서 cytochrome P<sub>450</sub>의 함량이 증가하였다는 Astrom와 Depierre(19)의 보고와 유사한 경향이였다. 생체내의 steroid, hormone의 변화나 외부의 독소 및 발암물질 등이 들어오면 cytochrome P<sub>450</sub>이 이들을 기질로 해서 결합하고 NADPH와 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase에 의해 전자를 공여 받아 환원된다. 이때 환원된 cytochrome P<sub>450</sub>은 second electron 즉 cytochrome P<sub>450</sub> reductase와 cytochrome b<sub>5</sub>에 의해서 ferrous superoxide complex가 되어 산소의 한 원자가 환원이 되면서 hydroxylation이 일어나고 H<sub>2</sub>O을 생산하면서 기질을 해독시킨다. 그러나 많은 발암물질이 체내에 들어오면 cytochrome P<sub>450</sub>은 더욱 더 활성화되고 그 결과 O<sub>2</sub>나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성되어 조직은 과산화를 초래한다(20). 그러나 본 연구에서는 항산화제인 비타민 E를 다량 투여했을 때 그 함량이 감소했는데 이러한 결과는 흰쥐에 카페인을 투여한 후 항산화제인 비타민 E의 급여수준을 높였을 때 cytochrome P<sub>450</sub>의 활성이 감소되었다는 결과와 유사하다.

Cytochrome P<sub>450</sub>과 함께 microsomal내에 존재하는 cytochrome b<sub>5</sub>는 분자량이 비교적 작은 단백질로서 이 물질대사 및 fatty acids, hormone 등의 대사시 여러 가지 산화 환원 반응에 관여하여 전자를 전달하는 물질로 알려져 있다(10). 또 Lu 등(21)에서도 cytochrome b<sub>5</sub>는 결정적인 요소는 아니지만, NADPH-dependent hydroxylation 과정에서 조절효과가 있다고 한다. 본 실험에서 STZ 유발 당뇨쥐에서의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량

변화는 대조군에 비해 DM-0E 및 DM-40E군은 약 2배씩 증가하였으나 DM-400E군은 대조군과 유의성이 없었다. 또 DM-400E군은 DM-0E, DM-40E군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였다.

NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase는 MFO에 존재하고 있으며 endogeneous substance와 이물질 대사에 많은 작용을 하고 분자내 산화, 환원 반응에 있어서 요구되는 두개의 전자 중 하나를 운반하며, flavoprotein component로서 전자를 terminal oxidase인 cytochrome P<sub>450</sub>로 전달하는데 촉매 역할을 담당하고 있다.

본 실험에서 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성이 대조군과 비교했을 때 DM-0E군에서는 58% 증가하였고 DM-40E군에서는 47% 증가하였지만 DM-400E군은 대조군 수준이었다. 이와 같이 식이내 vitamin E의 공급수준에 따라 cytochrome b<sub>5</sub>와 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase가 감소하는 경향이였다. 이러한 결과는 발암물질인 2-acetylaminofluorene(2-AAF)를 투여했을시 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성도가 증가했으나 여기에 식이내 항산화제인 BHT를 약 0.3% 첨가한 식이군은 그 활성이 대조군 수준이었다는 김과 최(9) 및 Astrom과 Depierre(19)의 결과와 유사하였다.

이상과 같이 STZ 유발 당뇨쥐에서는 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub>, NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 등의 활성이 증가하였으나 vitamin E 공급 수준에 따라 이들의 활성이 감소하였다. 이러한 MFO계의 활성 증가는 체내기질인 steroid, hormone 등과 외부의 환경물질 등이 들어왔을 때 이들을 해독하기 위한 생체조절 기능으로써 그 합성이 유도되었다고 볼 수 있다. 또 식이 중 vitamin E의 공급에 따라 MFO계의 활성이 감소된 것은 약물대사 작용에서 종, 성별, 나이, 영양상태도 영향을 미친다는 Astrom 등(22)을 비롯한 여러 보고(9,13,22)에 의해서도 입증되어지고 있다. 또 폐조직에서도 cytochrome P<sub>450</sub>를 비롯한 MFO계의 활성이 높았는데 이러한 결과는 간, 폐, 신장, 뇌, 태반 및 피부 등의 소포체에서 많이 존재한다는 김과 송(23)의 보고와 일치한다. 본 실험에서는 체내 과산화적 손상의 지표인 지질과산화물값을 간장 및 폐조직의 microsome에서 관찰한 결과 간장조직에서 대조군에 비해 STZ 유발 당뇨군인 DM-0E군, DM-40E군은 각각 143%, 95% 정도 높았으며, DM-400E는 31% 정도 높았다. 이와같이 모든 당뇨유발군에서는 대조군에 비해 지질과산화물값이 높았으며 또 식이 vitamin E의 공급수준에 따라 지질과산화물의 생성이 감소되었다. 폐조직에서의 경향도 이와 비슷하였으나 간조직 보다 지질과산화적 손상이 다소 높았다.

본 실험의 당뇨유발군에서 MFO계의 활성이 증가되면서 지질과산화물 생성이 증가되었으나 식이 vitamin E 함량을 증가시켰을 때 이들 값이 동시에 감소하였다. 이러한 결과는 Prichard 등(24)이 STZ로 당뇨유발된 쥐에 비타민 E를 투여한 후 혈장과 간조직에서 지질과산화물의 축적이 감소되었다는 보고와 일치하였으며, 2-AAF로 암 유발 흰쥐에서 증가되었던 지질과산화물이 항산화제인 BHT를 투여했을시 감소되었다는 김(25)의 보고와도 일치하였다. 이는 BHT가 발암물질과 결합하여 비활성물질로 전환시키거나 발암물질의 자극으로 생성된 free radical을 제거하였기 때문이라고 보고했듯이 항산화제인 비타민 E의 작용도 BHT와 같은 기능으로 작용한 것으로 생각된다.

이상과 같이 당뇨유발군에서는 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub>와 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 등의 MFO계의 활성이 증가되고 지질과산화값의 증가도 같은 양상으로 높아진 것으로 보아 MFO계의 활성에 따른 free radical 생성의 증가로 지질과산화물값이 촉진되었음을 짐작할 수 있다. 또 식이 vitamin E의 공급수준에 따라 MFO계 활성이 억제되는 양상과 지질과산화값의 감소 양상이 비슷한 경향인 것으로 보아 vitamin E의 항산화적 기능에 의한 MFO계의 활성저하의 결과로 생각된다. 따라서 식이내 항산화제의 적절한 공급은 free radical 생성계인 MFO계 효소의 활성을 감소시키고, 지질과산화물 생성도 억제시킬 수 있다. 그러므로 당뇨병과 같은 병리적인 상태에서는 비타민 E가 과산화적 손상을 완화시키는 점에서 중요하다고 볼 수 있다.

## 요 약

본 연구는 streptozotocin 유발 당뇨쥐의 간과 폐조직에서의 MFO계 활성 변화 및 지질과산화에 미치는 vitamin E의 영향을 관찰하고자 본 실험을 행하였다. 체중 140g 정도의 Sparague-Dawley종 숫컷을 대조군(40mg vitamin E/kg diet group)과 당뇨유발 실험군으로 나누어 후 실험군은 다시 식이내 vitamin E 공급수준에 따라 DM-0E군(0mg vitamin E/kg diet group), DM-40E군(40mg vitamin E/kg diet group), DM-400E군(400mg vitamin E/kg diet group) 나누어 4주간 사육한 후 대조군을 제외한 실험군을 STZ로 당뇨를 유발시켰다. 당뇨 유발 6일 후 쥐를 희생시켜 간조직 및 폐조직 microsome 중의 cytochrome P<sub>450</sub> 및 cytochrome b<sub>5</sub> 함량과 NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성도를 측정하고 아울러 microsome내의 지질과산화물을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1. 간조직 중의 cyto-

chrome P<sub>450</sub> 함량은 대조군에 비해 DM-0E군, DM-40E군 및 DM-400E군이 각각 162%, 150%, 56% 증가하였으며 또 DM-400E군은 DM-0E, DM-40E군에 비해 낮았다. 폐조직 중의 cytochrome P<sub>450</sub> 함량도 간조직에 비해 함량은 낮았지만 경향은 비슷하였다. 2. 간조직 중의 cytochrome b<sub>5</sub>은 대조군에 비해 DM-0E군, DM-40E군은 각각 70%, 53%씩 증가하였으나 DM-400E군은 대조군 수준이었다. 폐조직 중의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량도 대조군에 비해 DM-0E, DM-40E 및 DM-400E군에서 각각 149%, 116%, 50%씩 증가하였다. 3. 간조직에서의 cytochrome P<sub>450</sub> reductase 활성은 대조군에 비해 DM-0E군은 58%, DM-40E군에서는 47% 증가하였으며 DM-400E는 대조군 수준이었다. 폐조직에서도 간조직에서와 비슷한 경향이였다. 4. 간조직의 지질과산화물가는 대조군에 비해 DM-0E군, DM-40E군, DM-400E군이 각각 143%, 95%, 31%씩 높았다. 또 DM-400E군은 DM-0E, DM-40E군에 비해 약 50% 정도 낮았다. 폐조직에서도 경향은 비슷했는데 간조직 보다 과산화적 손상이 다소 높았다. 이상의 결과에서 STZ 유발 당뇨쥐에서는 MFO system의 활성이 증가되고 지질과산화가 촉진되었다. 그러나 식이 중의 vitamin E의 적절한 공급은 MFO system 활성이 저하되고 과산화적 손상이 현저하게 완화됨을 볼 수 있었다.

### 문 헌

1. Hoguchi, Y. : Lipid peroxides and  $\alpha$ -tocopherol in rat STZ-induced diabetes mellitus. *Acta Med. Okayama*, **35**, 165(1982)
2. Scarpa, M., Rigo, A., Maiorino, M., Urisini, F. and Gregolin, C. : Formation of  $\alpha$ -tocopherol radical and recycling of  $\alpha$ -tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidyl cholin liposomes : An electron paramagnetic resonance study. *Biochem. Biophys. Acta*, **801**, 215(1984)
3. 이순재, 김관유 : Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 간장 및 폐조직에서의 microsomal mixed function oxidase system과 과산화지질 생성. *한국영양학회지*, **25**, 21(1996)
4. Remmer, H. : The role of the liver in drug metabolism. *Am. J. Med.*, **49**, 617(1970)
5. Miller, J. A. : Carcinogenesis by chemicals : An overview-GHA Clowes memorial lecture. *Cancer Res.*, **30**, 559(1970)
6. Astrom, A. and Depierre, J. W. : Characterization of the induction of drugmetabolizing enzymes by 2-acetylaminofluorene. *Biochem. Biophys. Acta*, **673**, 225(1981)
7. Chow, C. K. : Cellular antioxidant defense mechanisms. CRC Press, Vol. I, p.4(1988)
8. Bidlack, W. T. and Tappel, A. L. : Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids*, **8**, 177(1973)

9. 김현아, 최혜미 : 2-Acetylaminofluorene과 choline 결핍이 서로 다른 지방을 섭취한 쥐간의 지질과산화 반응 및 glucose 6-phosphatase, glutathione S-transferase 활성도에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **23**, 418(1990)
10. 임경숙 : 식이지방과 butylated hydroxytoluene이 2-acetylaminofluorene을 투여한 쥐간의 지질과산화도 및 과산화물대사 효소에 미치는 영향. *서울대학교 이학박사학위 논문*(1988)
11. Chen, J., Mabel, P., Goetchirs, T., Campbell, C. and Getald, F. C. JR. : Effects of dietary selenium and vitamin E on hepatic mixed-function oxidase activities and *in vivo* covalent binding of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats. *J. Nutr.*, **112**, 324(1982)
12. Nair, P. P., Murty, H. S., Cassi, P. I., Brooks, S. K. and Quartner, J. : Vitamin E regulation of the biosynthesis of porphyrins and heme. *Food Chem.*, **20**, 476(1972)
13. 박미리, 조수열 : 흰쥐 간에 있어 지질과산화에 미치는 식이성 비타민 E의 수준 및 카페인 영향. *한국영양학회지*, **23**, 561(1994)
14. 백태홍, 전세열, 김정호 : 영양학 실험. 수확사, p.137(1988)
15. Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370(1964)
16. Masters, B. S. S., Williams, C. H. and Karmin, H. : The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome C reductase from Pig liver. *Meth. Enzymol.*, **10**, 551(1967)
17. Satoh, K. : Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica. Chemica. Acta*, **90**, 37(1978)
18. Lowry, O. H., Rosenbrouth, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Boil. Chem.*, **193**, 265(1951)
19. Astrom, A. and Depierre, J. W. : Rat liver microsomal cytochrome P-450 purification, characterization, multiplicity and induction. *Biochemical etbiophysica Acta*, **853**, 1(1986)
20. Bidlack, W. T. and Tappel, A. L. : Damage to microsomal membrane by lipidperoxidation. *Lipids*, **8**, 177(1973)
21. Lu, A. Y. H., West, S. B., Vore, M., Ryan, D. and Levin, W. : Role of cytochrome b<sub>5</sub> in hydroxylation by a reconstituted cytochrome P<sub>450</sub> containing system. *J. Boil. Chem.*, **249**, 6701(1974)
22. Astrom, A., Meijer, J. and Depierre, J. W. : Characterization of the microsomal cytochrome P<sub>450</sub> species induced in rat liver by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.*, **43**, 342(1983)
23. 김기웅, 송용범 : 급성 납중독된 흰쥐의 이물질 대사효소의 활성도에 관한 연구. *한국생화학학회지*, **27**, 87(1994)
24. Prichard, K. A., Patel, S. T., Karper, C. W., Newman, H. A. I. and Panganamala, R. V. : Triglyceride-lowering effects of dietary vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. Increased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes*, **35**, 278(1986)
25. 김경민 : 식이지방의 종류 및 BHT가 발암물질을 투여한 쥐간의 microsomal mixed function oxidase system에 미치는 영향. *서울대학교 석사학위 논문*(1988)

(1996년 10월 2일 접수)