

비타민 C의 보강이 당뇨쥐의 간 소포체와 미토콘드리아의 Cytochrome P450계에 미치는 영향

정연재 · 임은영 · 김해리[†]
서울대학교 식품영양학과

Effect of Ascorbic Acid Supplementation on Hepatic Microsomal and Mitochondrial Cytochrome P450 System in Diabetic Rats

Yon-Jae Chung, Eun-Young Lim and Harriet Kim[†]

Dept. of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract

This study was performed to investigate whether ascorbic acid can modulate the induction of CYP2E1 and prevent the lipid peroxidation which may cause diabetic chronic complication. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin to 5-week-old male Sprague-Dawley rats(150~170g). Normal and diabetic group was randomly divided into three groups each; Control(CON, no supplementation), SUP1(50mg/d ascorbate supplementation) and SUP2(250mg/d ascorbate supplementation). Ascorbic acid was prepared daily by dissolving in drinking water and supplied for 4 weeks. There was no difference in hepatic microsomal and mitochondrial P450 contents between normal and diabetes. Hepatic microsomal N-nitrosodimethylamine(NDMA) demethylase activity, which represents contents of CYP2E1, was elevated in diabetes, but not significantly. The NDMA demethylase activity of diabetic SUP2 group was significantly lower activity than that of the diabetic CON group. However, no difference in hepatic mitochondrial NDMA demethylase activity was observed between the diabetes and the normal group. The result suggests that the induction of CYP2E1 in diabetes can be alleviated by ascorbic acid supplementation at the dose of 50mg/d. In addition, ascorbic acid supplementation showed dose-dependent reduction of hepatic microsomal TBARS contents in diabetic rats.

Key words: ascorbic acid, diabetes, cytochrome P450, CYP2E1

서론

Cytochrome P450 의존성 약물대사 반응은 독성물질의 체외 배설에 작용할 뿐 아니라, 기질을 더욱 독성이 강한 대사산물로 전환시킬 수 있기 때문에 관심이 모아진다(1). 또한, 외인성 물질의 대사과정 중에 oxycytochrome P450 complex의 자동산화가 superoxide anion을 생성하고, 이것이 Haber-Weiss 반응을 통해 H₂O₂와 반응하여 hydroxyl radical을 생성할 수 있다(2). Reconstituted membrane을 이용한 실험에서, O₂⁻에 의한 지질과산화가 다른 isozyme 보다 CYP2E1에 의해 더 빠르게 초래되며 CYP2E1의 함량과 O₂⁻, H₂O₂의 생성 사이에 양의 상관관계가 존재함이 보고되어 CYP2E1이 약물을 reactive intermediate로 전환시키는데 있어 다

른 isozyme 보다 더 큰 활성을 보임이 알려졌다(3). 이런 CYP2E1이 streptozotocin이나 alloxan으로 당뇨를 유도한 쥐에서 정상쥐 보다 5~8배 증가하며(4), 자발적으로 유발된 당뇨(NIDDM)에서도 마찬가지로 증가됨이 보고되었고(5) 그 함량은 체내 당화물질의 지표로서 사용되는 HbA_{1c}의 함량과 양의 상관관계를 보였다(6). 따라서, 당뇨환자에 있어서 보이는 만성 합병증에 있어 CYP2E1의 유도에서 기인하는 산화적 스트레스의 가능성을 간과할 수 없다.

Cytochrome P450은 세포내 소포체에 대부분이 존재하며 적은 양이 미토콘드리아에 존재한다. 최근 ethanol과 phenobarbital을 공급한 쥐의 뇌 mitochondrial cytochrome P450의 함량과 NDMA demethylase의 활성이 소포체 보다 2배 이상 증가한 것이 보고(7)되어 당

[†]To whom all correspondence should be addressed

노시 유도되는 CYP2E1이 간 미토콘드리아에서도 소포체와 마찬가지로 유도되어질 수 있음이 알려졌다.

이런 약물대사계 효소는 비타민 C의 영향을 받는데, 비타민 C가 결핍된 guinea pig의 경우 cytochrome P450의 함량이 감소하고 약물의 체내 잠재시간이 증가한다(8). 이런 약물 대사계의 변형은 비타민 C의 결핍이 P450의 특정 isozyme의 양을 증가 또는 감소시키는데서 기인한다. 비타민 C의 과잉섭취시 결핍과 비슷한 양상의 증강을 보이는데(9), 비타민 C의 결핍시 CYP2E1의 함량이 감소하므로(10) 비타민 C의 과잉섭취가 CYP2E1의 함량에 영향을 줄 가능성이 있다. 또한 비타민 C는 지용성 항산화제인 α -tocopherol, β -carotene과 수용성 혈장 항산화제인 protein thiol, bilirubin, urate 보다 우수한 항산화능력을 보이고 수용성 라디칼에 대한 1차 방어선을 형성한다(11).

이에 본 연구에서는 streptozotocin으로 당뇨를 유도하여 당뇨 합병증의 기전으로 제시되는 산화적 스트레스에 있어 비타민 C가 항산화효과 뿐 아니라 CYP2E1의 억제를 통해서 효과를 보이는지 간 소포체와 미토콘드리아에서 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

생후 5주된 Sprague-Dawley종 숫쥐 150~170g이 된 것을 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받아 1주일간 환경에 적응시킨 뒤 2군으로 나누었다. 13시간 금식시킨 후 그중 한군은 0.07M citrate buffer(pH 4.5)에 streptozotocin을 65mg/kg 체중이 되도록 녹인 뒤 복강에 1회 주사하여 당뇨를 유도하였다. 당뇨 유도 3일 후 꼬리의 정맥혈을 취하여 비공복시 혈당이 300 mg/dl 이상인 경우에만 당뇨로 분류하였다. 다시 정상군과 당뇨군을 각각 10마리씩 3군으로 나누어 각 실험 식이로 4주간 사육하였다. 정상군과 당뇨군은 각각 비타민 C를 보강하지 않은 대조군(CON), 비타민 C를 50 mg/d로 보강한 군(SUP1), 비타민 C를 250mg/d로 보강한 군(SUP2)으로 나누었다. 비타민 C는 물에 녹여 공급하였고, 하루에 섭취하는 비타민 C의 양은 전날 마신 물의 양을 기준으로 매일 제조하였다.

시료의 수집 및 전처리

실험 동물은 16시간 동안 금식시킨 후 희생시켰다. 희생시키기 직전에 체중을 측정하고, 희생시킨 후 쥐의 경동맥에서 공복시 혈당을 측정하였다. 간 조직은 적출하여 차가운 생리식염수에 세척한 후 액체 질소로

급속냉동시켜 -70°C 에서 냉동보관하였다가 실험에 사용하였다. 간 microsome의 분리는 Raucy와 Lasker(12)의 방법을, 간 mitochondria의 분리는 Schnaitman 등(13)과 Shayiq 등(14)의 방법을 변형하여 사용하였다. 미토콘드리아는 오염을 최소화하기 위해 여러번 세척하였고 digitonin으로 처리하여 외막을 제거하였다.

Mitochondria의 전자현미경 사진

간 mitochondrial suspension을 transparant electron microscopy(TEM)를 사용하여 관찰하였다(13).

Glucose-6-phosphatase(G6Pase)의 활성도 측정

간 microsome과 mitochondria에서 glucose-6-phosphatase의 활성도를 측정하였다(15).

간 조직의 cytochrome P450 함량 측정

간 소포체와 미토콘드리아의 cytochrome P450의 함량을 Omura와 Sato(16)의 방법으로 측정하였다.

간 조직의 NDMA demethylase 활성도 측정

간 소포체와 미토콘드리아의 N-nitrosodimethylamine(NDMA) demethylase 활성도를 측정하였다(17). 50mM Tris-HCl(pH 7.4), 10mM MgCl_2 , 50mM KCl, 1mM NADPH, 4mM NDMA에 간 소포체는 1mg protein 정도 되도록 희석하여 37°C 에서 10분간 incubation하였다. 여기에 25% ZnSO_4 와 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 포화용액을 가하여 반응을 종결시키고 7,500g에서 원심분리한 후, 상층액을 취해 바로 제조한 Nash reagent를 가하였다. 50°C 에서 30분간 incubation한 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. Mitochondrial suspension도 동일한 방법으로 측정하였고, 표준용액으로는 37% formaldehyde용액을 사용하였다.

간 세포 CYP2E1의 Western immunoblot analysis

20 μg 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동한 후, nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell INC.)으로 단백질을 이동시켰다. Membrane은 3% bovine serum albumin용액(in Tris buffered saline; 10mM Tris-base, 150mM NaCl, pH 7.5)에 담가 shaking한 후, Tris-buffered saline용액(TBS용액)으로 5분씩 5회 shaking하면서 세척하였다. CYP2E1에 대한 polyclonal antibody용액(1 : 400)을 사용하여 4°C 에서 하룻밤 동안 방치하였고 다시 TBS용액으로

로 5분씩 5회 shaking하면서 세척하였다. Second antibody는 alkaline phosphatase가 conjugation되어 있는 goat antirabbit IgG(Jackson ImmunoResearch INC.)를 5000배 희석하여 사용하였고, developing buffer에 NBT와 BCIP를 2 : 1로 섞어 빛이 들지 않는 곳에서 5분간 발색시켰다. 표준물질로는 bovine serum albumin 10 µg 단백질을 loading하여 사용하였다. CYP2E1에 대한 polyclonal antibody는 미국 National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism의 Laboratory of Metabolism and Molecular Biology에서 공급받아 사용하였다.

간 mitochondrial suspension도 동일한 방법으로 분석하였다(18).

간 소포체의 TBARS 함량 측정

간 소포체는 10mM phosphate buffer(pH 7.4)로 균질화시킨 후, 액체 질소로 급속냉동시켜 -70°C에서 냉동보관 후, Ohkawa 등(19)의 방법을 이용하여 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)의 양을 측정하였다. 표준용액으로는 tetraethoxypropane(TEP)을 methanol에 녹여서 사용하였다.

단백질 함량 측정

간 microsome과 mitochondria의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 Lowry 등(20)의 방법으로 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 SAS general linear models procedure를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 계산하고, $p < 0.05$ 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군간의 유의차를 검증하였다. 각 변수간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient로 알아보았다.

결과 및 고찰

Mitochondria의 오염도 측정

간 소포체와 미토콘드리아에 존재하는 NDMA demethylase의 활성과 cytochrome P450, CYP2E1의 함량을 측정하여 정확히 비교하기 위해, 간 미토콘드리아가 소포체에 의해 오염되지 않았음을 확인할 필요가 있다. 본 실험에서는 mitochondrial suspension의 transparent electron microscopy(TEM) 사진과 소포체 막에 존재한다고 알려진 glucose-6-phosphatase의 활성

을 비교해 보았다.

Mitochondrial suspension의 TEM 사진을 Fig. 1에 제시하였다. 미토콘드리아는 내부 cristea가 보이고 digitonin의 처리로 대부분의 외막이 떨어진 것으로 보이나, swelling되어 대부분 intact mitochondria로는 존재하지 않는다. Table 1은 간 소포체와 미토콘드리아의 glucose-6-phosphatase(G6Pase)의 활성을 비교제시하였다. 당뇨병시 G6Pase의 활성이 증가하기 때문에 정상군과 당뇨병군을 나누어 비교하였다. 정상군에 있어서 미토콘드리아의 G6Pase의 활성이 소포체의 13%가량이며, 당뇨병군에 있어서는 소포체의 약 21%에 해당한다. 이는 G6Pase의 활성이 미토콘드리아에서 보통 5% 이하로 측정되는 것을 고려할 때 완전한 분리가 이루어지지는 않았다고 할 수 있고, 각 시료의 오염정도가 미토콘드리아의 P450 함량과 NDMA demethylase의 활성에 영향을 주었으리라 생각된다.

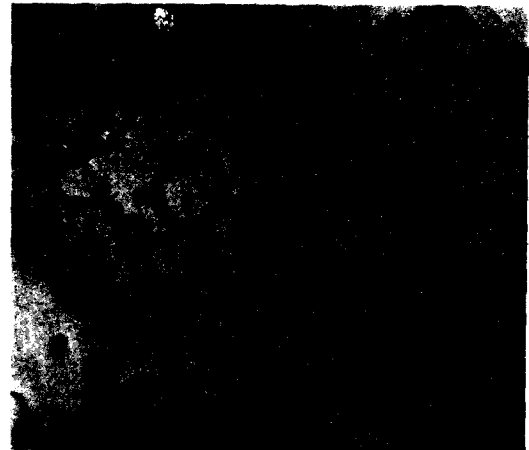


Fig. 1. Electron micrograph of isolated liver mitochondria ($\times 20,000$).

Table 1. Glucose-6-phosphatase activity in hepatic microsome and mitochondria of diabetic rats

Group	Glucose-6-phosphatase activity (nmoles P_i liberated/mg protein)
Normal	
Microsome	242.52 \pm 73.09 ^b (10)
Mitochondria	32.40 \pm 20.67 ^d (12)
Diabetes	
Microsome	465.86 \pm 98.09 ^a (15)
Mitochondria	96.23 \pm 40.59 ^c (17)

Values are mean \pm S.D.

Means with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. The numbers in the parenthesis represent the number of the rats for the specific measurement.

Cytochrome P450의 함량

간 소포체 cytochrome P450의 함량은 전반적으로 당뇨병에서 증가하였으나 정상군과 유의적인 차이는 보이지 않았다(Table 2). 이것은 streptozotocin(STZ), alloxan으로 유발한 당뇨병(DDM)과 자발적 당뇨병(NIDDM)에서 P450의 함량에 변화가 없었다는 Dong 등(21)의 보고와 일치한다. 그러나, 다른 보고에서는 STZ으로 유발한 당뇨병과 NIDDM 환자의 간에서 P450의 함량이 증가하였다고 하였다(22). 간 미토콘드리아의 cytochrome P450의 함량은 당뇨 SUP1군에서 유의적으로 높은 P450의 함량을 보였고, 당뇨의 다른 군과 정상군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. P450의 여러 isozyme중 P450IIIc1은 당뇨시에 증가하는 반면 P450IIc2와 P450IIA1은 그 함량이 감소하는 것으로 보고되어(23) 당뇨에 의해 약물대사 과정의 기질 특이적인 변화가 보여 전체 P450의 함량에 영향을 줄 것으로 사료되며, 간 소포체와 간 미토콘드리아 cytochrome P450 함량은 상관관계를 보이지 않아 비타민 C의 공급이 간 세포 약물대사계에 미치는 영향이 세포 소기관에 따라 차이가 있을 것으로 사료된다.

비타민 C 보강은 간 소포체 cytochrome P450의 함량에 영향이 없었고 정상과 당뇨의 SUP1군에서 약간 상승한 것으로 나타났다. 간 미토콘드리아의 경우 당뇨 SUP1군을 제외하고 차이를 보이지 않았다. Sutton 등(24)의 보고에 따르면 guinea pig에게 비타민 C의 양을 달리하여 공급하였을 때 50mg/d로 공급한 경우 간 소포체 P450의 함량이 대조군의 약 120%로 증가한 반면 250mg/d로 과량 공급한 경우 오히려 P450의 함량이 대조군의 약 80%로 감소한다. 본 실험에서 대조군을 100%로 보았을 때 정상군의 경우 비타민 C를 50mg/d 보강한

군(SUP1)은 대조군의 116%, 비타민 C를 250mg/d 보강한 군(SUP2)은 대조군의 98%였다. 당뇨병의 경우 SUP1은 대조군의 114%, SUP2는 대조군의 91%로 정상군과 유사한 경향을 보였다. Sutton의 경우 비타민 C를 체내 합성하지 못하는 guinea pig를 그 대상으로 하였고 본 실험은 비타민 C를 합성할 수 있는 쥐를 사용하였으므로 그 증가와 감소의 폭이 유의적이지 않았을 가능성이 있다.

NDMA demethylase의 활성도

N-Nitrosodimethylamine(NDMA)은 발암원으로 체내 대사과정을 거치면서 발암물질로 전환되는데 cytochrome P450 의존성 약물대사 반응에 의존한다. NDMA의 α 탄소의 hydroxylation은 불안정한 중간물질을 거쳐 formaldehyde와 궁극적인 발암물질로 알려진 친전자성 alkylating 물질로 전환된다(25). Km값이 높은 NDMA demethylase가 CYP2E1에 의해 유도되는 것으로 알려져 소량의 NDMA에 대한 NDMA demethylase의 활성은 CYP2E1의 함량을 반영한다(26).

간 소포체 NDMA demethylase의 활성은 당뇨병에서 증가하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았고(Table 2), 이는 streptozotocin에 의해 NDMA demethylase의 활성이 64%, alloxan에 의해서는 120%가 증가하였다는 보고와는 차이가 있다(21). 당뇨 SUP2군의 NDMA demethylase의 활성이 유의적으로 감소하였고, 정상군에 있어서는 비타민 C의 공급량에 따른 차이를 보이지 않았다. 간 미토콘드리아의 NDMA demethylase 활성은 정상군과 당뇨병에서 유의적인 차이를 보이지 않았고 SUP2군에서 유의적이지는 않으나 NDMA demethylase의 활성이 감소하였다.

Table 2. Effect of ascorbic acid supplementation on hepatic cytochrome P450 contents and NDMA demethylase activities in rats

Group	Cytochrome P450 (nmol/mg protein)		NDMA-demethylase activity (nmols HCHO/min/mg protein)	
	Microsome	Mitochondria	Microsome	Mitochondria
Normal				
CON	0.587±0.32 ^{NS} (3)	1.172±0.56 ^b (4)	0.784±0.08 ^{ab} (4)	0.386±0.09 ^{NS} (4)
SUP1	0.683±0.25(4)	1.437±0.26 ^a (4)	0.781±0.13 ^{ab} (6)	0.370±0.10(6)
SUP2	0.578±0.24(5)	1.863±1.12 ^{ab} (5)	0.696±0.07 ^{ab} (7)	0.318±0.05(8)
Diabetes				
CON	0.710±0.22(6)	1.392±0.94 ^b (6)	0.867±0.17 ^a (6)	0.443±0.11(6)
SUP1	0.815±0.36(4)	3.157±2.0 ^a (4)	0.831±0.22 ^a (5)	0.542±0.33(5)
SUP2	0.643±0.34(6)	1.367±0.69 ^b (6)	0.611±0.04 ^b (5)	0.366±0.09(5)

Values are mean±S.D.

Means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test

The numbers in the parenthesis represent the number of the rats for the specific measurement

^{NS}Not significant

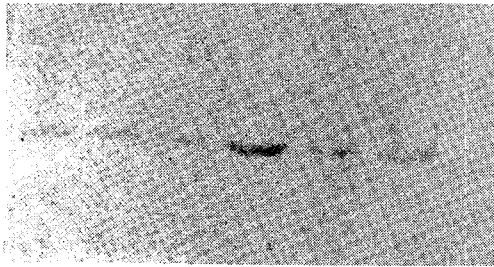


Fig. 2. Immunoblot quantification of hepatic microsomal CYP2E1 from control and diabetic rats with *l*-ascorbic acid supplementation.

Lane 1: Normal control
Lane 2: Normal supplement 1
Lane 3: Normal supplement 2
Lane 4: Diabetes control
Lane 5: Diabetes supplement 1
Lane 6: Diabetes supplement 2
20 μ g microsomal protein were subjected to 10% SDS-PAGE. Immunoblotting by alkaline phosphatase conjugated with goat antirabbit immunoglobulin G was then carried out.

비타민 C의 결핍은 CYP2E1을 유의적으로 감소시키며 결핍상태에서 보이는 약물대사계의 변화는 비타민 C를 과량으로 먹일 경우에도 그 양상이 유사하다(9). 따라서 당뇨병에 있어서 과량의 비타민 C가 CYP2E1의 함량을 낮추어 NDMA에 의한 독성을 줄일 수 있는 가능성을 시사한다. 본 연구에서 간 소포체 NDMA demethylase의 활성을 낮췄으나 간 미토콘드리아에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

CYP2E1의 함량

CYP2E1은 ethanol에 의해 유도되는 P450으로 N-nitrosodimethylamine과 같은 발암원을 활성화시키고 약물대사 과정에서 유리 활성라디칼을 생성한다(3). CYP2E1에 대한 western blot 결과(Fig. 2)에서 lane 1~3은 정상군을, lane 4~6은 당뇨병군을 나타내며 각각은 대조군, SUP1, SUP2로 구분된다. Lane 4의 당뇨 대조군에서 정상군에 비해 CYP2E1의 함량이 상당히 증가한 것으로 나타난다. 정상군의 경우 비타민 C의 공급량에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 당뇨병군의 경우 비타민 C를 50mg/d(lane 5), 250mg/d(lane 6) 보강한 군에서 CYP2E1이 정상군과 비슷하게 낮아진 것을 알 수 있다. 이는 당뇨병시에 CYP2E1이 증가한다는 Song 등(4), Dong 등(21)의 보고와 일치한다. 당뇨병시에 나타나는 CYP2E1의 유도는 그 mRNA의 안정화 때문으로, insulin의 투여로 정상화될 수 있다(24). IDDM 환자의 lymphocyte CYP2E1의 함량과 혈중 당화산물인 HbA_{1c}의 함량이 양의 상관관계가 있다는 보고는 CYP2E1이 당뇨의 당화과

정에 영향이 있을 것을 보여준다(6).

본 실험에서 비타민 C의 과량 보강은 당뇨병으로 인한 CYP2E1의 함량을 낮추는데 효과가 있으며, 이런 효과는 50mg/d의 보강으로도 나타나 250mg/d의 보강에서만 유의적인 감소를 보인 NDMA demethylase의 결과와는 약간의 차이를 보인다. 따라서, CYP2E1과 NDMA demethylase의 활성을 동시에 감소시키는 비타민 C의 최소량을 결정하기 위한 실험이 요구된다.

간 미토콘드리아의 경우 소포체와 동일한 양의 단백질을 loading하여 실험하였을 때 CYP2E1의 발현이 나타나지 않았다. 이는 간 미토콘드리아에 존재하는 CYP2E1의 함량이 매우 낮아(7) 나타나지 않았을 수 있고, 당뇨병으로 인한 CYP2E1의 유도가 간 미토콘드리아에서는 일어나지 않거나 아주 미미하게 변화하기 때문인 것으로 생각되며, 아직 당뇨에 의한 간 미토콘드리아 CYP2E1의 유도에 대한 연구는 거의 이루어지지 않아 더 많은 연구가 필요하다.

간 소포체의 NADPH-cytochrome c reductase의 활성

NADPH-cytochrome c reductase는 1단계 약물대사 효소의 하나로 전자공여체로 NADPH를 소비하면서 monooxygenase계를 환원시키는 역할을 하며, 효소반응 과정에서 linoleic acid를 소비하므로 NADPH의 존손 과산화반응을 일으켜 지질과산화물을 증가시키고 hydroxylation 과정을 거치는 약물에 대해서는 전자공여체를 놓고 경쟁을 하기도 한다. 간 소포체의 NADPH-cytochrome c reductase 활성도의 측정 결과를 Table 3에 나타내었다. 정상군의 경우 비타민 C의 보강량이

Table 3. Effect of ascorbic acid supplementation on hepatic microsomal NADPH-cytochrome c reductase and TBARS contents in diabetic rats

Group	NADPH-cytochrome c reductase activity (nmoles DCIP/min/mg protein)	TBARS (nmoles MDA/mg protein)
Normal		
CON	70.58 ± 17.22 ^a (7)	0.427 ± 0.09 ^{bc} (7)
SUP1	63.79 ± 16.69 ^{ab} (9)	0.347 ± 0.06 ^c (8)
SUP2	46.32 ± 9.40 ^c (9)	0.379 ± 0.10 ^c (7)
Diabetes		
CON	50.80 ± 17.30 ^{bc} (6)	0.686 ± 0.11 ^a (5)
SUP1	72.24 ± 4.63 ^a (4)	0.495 ± 0.05 ^b (4)
SUP2	50.75 ± 10.91 ^{bc} (7)	0.347 ± 0.06 ^c (7)

Values are mean ± S.D.

Means with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

The numbers in the parenthesis represent the number of the rats for the specific measurement

증가할수록 활성이 감소하는 경향을 보였고, 비타민 C를 많은 양 보강한 군에서만 유의적인 감소가 있었다. 당뇨군은 오히려 정상군 보다 낮은 활성을 보여, 이는 alloxan과 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 쥐에서 정상군에 비해 유의적인 증가를 보이지 않았다는 보고와는 차이가 있다(21).

당뇨군에 있어서는 비타민 C를 적은 양 보강한 군에서 대조군과 비타민 C를 많은 양 보강한 군에 비해 유의적인 증가를 보였다. 정상군과 당뇨군 모두 비타민 C를 많은 양 보강한 군에서 NADPH-cytochrome c reductase의 활성이 감소하는데, 이는 비타민 C의 결핍시 나타나는 NADPH-cytochrome c reductase의 활성 감소와 같은 기작에 의하는지는 더 연구가 요구된다. NADPH-cytochrome c reductase의 활성은 간 소포체에서의 NDMA demethylase의 활성과는 양의 상관관계($r=0.3904$, $p<0.05$; $n=31$)을 보였다.

간 소포체의 TBARS 함량

당뇨 CON군의 경우 정상군에 비해 유의적으로 높은 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량을 보여 당뇨시 산화적 스트레스로 인해 지질과산화물의 함량이 증가한다는 보고와 일치한다(25). 당뇨군에 있어서 비타민 C의 공급량이 증가함에 따라 TBARS 함량이 유의적으로 감소하였다. 정상군에 있어서도 비타민 C의 보강은 TBARS의 함량을 감소시켰으나 유의적이지는 않았다(Table 3).

지용성 비타민인 α -tocopherol은 지질막의 산화를 방지하는데 효과적이며 비타민 E가 결핍되었을 경우 비타민 C만으로는 간 소포체의 지질과산화를 유의적으로 감소시키지 않는다고 보고하였다(26). 또한, 비타민 C는 혈청에 존재하는 가장 우수한 항산화제로 bilirubin, uric acid, α -tocopherol, β -carotene 보다 혈중 LDL의 산화를 더 효과적으로 방지하여 동맥경화의 위험을 감소시키는데, 이는 수용액상의 peroxy radical을 제거하여 세포막 지질과산화의 initiation 단계를 저해하기 때문이다(11). 따라서, 비타민 C의 공급이 TBARS의 함량을 감소시킨 것은 수용액상의 peroxy radical을 제거하여 간 소포체 막의 지질과산화 initiation 단계를 막고, 비타민 E를 절약하여 비타민 E가 지질과산화의 propagation 단계를 효과적으로 저해하도록 돕는 2가지 기작에 의했다고 생각된다.

TBARS는 NDMA demethylase의 활성과 양의 상관관계($r=0.5486$, $p<0.005$; $n=27$)를 보여 CYP2E1의 유도가 지질과산화를 증가시킨 것으로 생각된다.

당뇨환자의 경우 혈장과 조직의 비타민 C의 함량이

감소하는 것으로 보고되는데(27), 간 조직내의 비타민 C의 함량과 TBARS의 함량 사이에 음의 상관관계가 보인다($r=-0.445$, $p<0.05$)는 보고는 체내 비타민 C의 pool 유지가 산화적 스트레스에 의한 지질과산화를 막는데 요구된다고 할 수 있다(28).

요 약

본 논문에서는 당뇨에 의한 CYP2E1의 유도와 이에 따른 지질과산화의 증가에 비타민 C가 미치는 영향을 간 소포체와 미토콘드리아에서 알아보도록 하였다. Cytochrome P450의 함량은 간 소포체와 미토콘드리아 모두에서 정상과 당뇨간에 차이를 보이지 않았고, 비타민 C의 공급은 영향이 없었다. Superoxide anion에 의한 지질과산화에 가장 큰 영향을 끼친다는 CYP2E1에 대하여 immunoblotting으로 그 함량을 알아본 결과, 간 소포체 CYP2E1이 당뇨에서 증가하고 비타민 C의 보강은 50mg/d의 공급으로도 현저한 감소를 보여 간 소포체 P450의 함량과는 다른 결과를 나타냈다. 간 미토콘드리아의 경우 소포체와 동량(20 μ g)의 단백질을 loading하였는데 CYP2E1의 발현을 볼 수 없었다. 간 소포체와 미토콘드리아 NDMA demethylase의 활성이 정상군과 당뇨군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 250mg/d의 비타민 C 공급시 간 소포체에서는 유의적으로, 간 미토콘드리아에서는 유의적이지는 않으나 감소하였다. NDMA demethylase의 활성은 CYP2E1의 함량을 반영한다고 알려져 있는데 본 연구에서는 동일한 pattern으로 진행되지는 않은 듯하다. NADPH-cytochrome c reductase의 활성은 NDMA demethylase의 활성과 양의 상관관계를 보였다. 따라서, 비타민 C의 공급은 당뇨에 의한 CYP2E1의 유도를 감소시키고 NDMA demethylase, NADPH-cytochrome c reductase와 같은 약물대사계 효소의 활성을 감소시켜 지질과산화를 낮출 것으로 사료된다. 그러나, 비타민 C의 공급량에 따라 조금씩 다른 결과를 보여 당뇨에 있어 가장 좋은 효과를 보일 수 있는 최적의 비타민 C 보강량을 결정하는 연구가 요구된다. 당뇨군에서 지질과산화의 지표인 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 함량이 간 소포체에서 유의적으로 증가하였고, 비타민 C의 공급에 의존하여 TBARS의 함량이 감소하였다. TBARS의 함량은 NDMA demethylase의 활성과 양의 상관관계를 보여 CYP2E1이 당뇨의 지질과산화에 영향을 끼친다고 생각된다. 이러한 비타민 C의 항산화 효과는 비타민 C 자체의 항산화 능력, 비타민 E와 glutathione 같은 다른 항산화제의 절약 효과, CYP2E1의 유도 저하를

통하는 것으로 생각되며 그중 어떤 것에 가장 큰 영향을 받는지는 아직 알려지지 않았고 더욱 많은 연구가 요구된다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제(D0197) 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Lu, A. Y. H. and West, S. B. : Multiplicity of mammalian microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Rev.*, **31**, 277(1980)
- Ekström, G. and Ingwman-Sundberg, M. : Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450(P-450III_{E1}). *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1313(1989)
- Albano, E. A., Tomasi, A., Persson, J. O., Terelius, Y., Gorla-Gatti, L., Ingelman-Sundberg, M. and Dianzani, M. U. : Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450III_{E1}) in catalysing the free radical activity of aliphatic alcohols. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1895(1991)
- Song, B. J., Matsunaga, T., Hardwick, J. P., Park, S. S., Veech, R. L., Yang, C. S., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Stabilization of cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol. Endocrinol.*, **1**, 542(1987)
- Bellward, G. D., Chang, T., Rodrigues, J., McNeill, J. H., Maines, H., Ryan, D. E., Levin, W. and Thomas, P. E. : Hepatic cytochrome P-450j induction in the spontaneously diabetic BB rat. *Mol. Pharmacol.*, **33**, 140(1988)
- Song, B. J., Veech, R. L. and Saenger, P. : Cytochrome P450III_{E1} is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 1036(1990)
- Bhagwat, S. V., Boyd, M. R. and Ravindranath, V. : Brain mitochondrial cytochrome P450 : Xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 73(1995)
- Ginter, E., Kosinova, A., Hudecova, A. and Miynarcikova, U. : Parabolic response of hepatic microsomal hydroxylating system and lipids to graded doses of ascorbic acid in guinea pigs on low and high α -tocopherol intake. *J. Nutr.*, **114**, 485(1984)
- Matsushita, N., Kobayashi, T., Oda, H., Horio, F. and Yoshida, A. : Ascorbic acid deficiency reduced the level of mRNA for cytochrome P-450 on the induction by polychlorinated biphenyls. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**, 289(1993)
- Kanazawa, Y., Kitada, M., Mori, T., Inukai, Y., Imaoka, S., Funae, Y. and Kamataki, T. : Ascorbic acid deficiency decreases specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes of guinea pigs. *Mol. Pharmacol.*, **39**, 456(1991)
- Frei, B., England, L. and Ames, B. N. : Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6377(1989)
- Raucy, J. L. and Lasker, J. M. : Isolation of P450 enzymes from human liver. In "Method in enzymology" Sidnery, P. C. and Nathan, O. K.(eds.), Academic Press, INC., New York, Vol. 206, p.577(1991)
- Schnaitman, C., Erwin, V. G. and Greenwalt, J. W. : The submitochondrial localization of monoamine oxidase: An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Cell. Biol.*, **32**, 719(1967)
- Shayiq, R. M., Addya, S. and Avadhani, N. G. : *Method in enzymology*. Academic Press, Inc., New York, Vol. 206, p.587(1991)
- Baginski, E. S., Foà, P. P. and Zak, B. : *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc., Vol. 2, p.876(1974)
- Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemo-protein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370(1964)
- Yang, C. S., Patten, C. J., Ishizaki, H. and Yoo, J. S. P. : *Method in enzymology*. Academic Press, Inc., New York, Vol. 206, p.595(1991)
- Bollag, D. M. and Elelstein, S. J. : *Protein methods*. Wiley-Liss Inc., USA, p.95(1991)
- Ohkawa, H., Ohish, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351(1979)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biochem.*, **193**, 265(1951)
- Dong, Z., Hong, J., Ma, Q., Li, D., Bullock, J., Gonzalez, F., Park, S. S., Gelboin, H. and Yang, C. S. : Mechanism of cytochrome P-450_{ac}(P450_{ac}) in chemically induced and spontaneously diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **263**, 29(1988)
- Knodell, R. G., Handwerker, B. S., Morley, J. E., Levine, A. S. and Brown, D. M. : Separate influence of insulin and hyperglycemia on hepatic drug metabolism in mice with genetic and chemically induced diabetes mellitus. *J. Pharmacol. Exp.*, **230**, 256(1984)
- Dannan, M. Q., Guengerich, G. A., Yang, F. P. and Yang, C. S. : Similarities and differences in the regulation of hepatic cytochrome P-450 enzymes by diabetes and fasting in male rats. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 3179(1989)
- Sutton, J. L., Basu, T. K. and Dickerson, W. T. : Effect of pharmacological doses of ascorbic acid on the hepatic microsomal haemoproteins in the guinea pig. *J. Nutr.*, **49**, 27(1983)
- Baynes, J. W. : Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405(1991)
- 장연진, 이재담, 박형섭 : 당뇨병 유발 백서에서의 간 세포질 단백질의 산화적 손상. *당뇨병*, **17**, 175(1993)
- Som, S., Basu, S., Mukherjee, D., Deb, S., Choudhury, P. R., Mukherjee, S., Chatterjee, N. and Chatterjee, I. B. : Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metabolism*, **30**, 572(1981)
- 정연재, 김해리 : 비타민 C의 보강이 당뇨쥐의 체내 비타민 C함량과 지질과산화에 미치는 영향. *서울대학교 생활과학회지*, **22**, 83(1997)

(1997년 4월 7일 접수)