

알데히드 옥시다제의 활성에 미치는 리도카인 및 프로카인아미드의 영향

허 근 · 김진숙 · 김대경 · 하은필 · 이상일* · 용철순#

영남대학교 약학대학, *계명문화대학 식품과학과

(Received August 6, 1999)

The Effect of Lidocaine and Procainamide on the Hepatic Aldehyde Oxidase Activity

Keun Huh, Jin-Sook Kim, Da-Qing Jin, Eun-Pil Ha, Sang-Il Lee* and Chul-Soon Yong#

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

*Department of Food Science, Keimyung College, Taegu 705-037, Korea

Abstract — Lipid peroxidation mediated by hydroxyl radicals which are generated during myocardial ischemia has been suggested as a possible mechanism of ischemic myocardial damage. Recently, it has been reported that anti-arrhythmic action of lidocaine, a local anesthetic, is attributed to its “membrane-stabilizing” properties through scavenging free radicals, thus, inhibiting lipid peroxidation. Aldehyde oxidase and xanthine oxidase which catalyze the oxidation of many purine, pyrimidine and pteridine derivatives are known as free radical generating systems. In this experiment, we studied the effect of lidocaine and procainamide on the hepatic aldehyde and xanthine oxidase activity and antioxidative activities. It was found that lidocaine and procainamide inhibited both NADPH-dependent and -independent lipid peroxidation. Both of tested compounds were found to be ineffective in inhibiting xanthine oxidase. Lidocaine and procainamide, however, inhibited aldehyde oxidase activity *in vitro* as well as *in vivo*. Based on the above results, lidocaine and procainamide could be employed as a therapeutic agent for aldehyde oxidase-related disease.

Keywords □ Lidocaine, lipid peroxidation, aldehyde oxidase.

부정맥은 심근의 활동전압 생성과 관련된 자동성의 변화 또는 흥분전도계의 장애로 인해 심박동수 및 규칙성에 변화가 초래되어 나타나는 것으로 허혈성 빈혈과 관련된 심근경색증, digoxin과 같은 강심제 투여시, 수술을 위한 마취시 뿐만 아니라, 전해질 이상 및 산혈증 등에서도 자주 발생하는 것¹⁾으로 알려져 있다.

부정맥의 원인은 myocardial ischemia가 일어나는 동안에 생성되는 superoxide 및 hydroxyl radical과 같은 oxygen free radical이 생체막 성분인 다가불포화지방산과 반응하여 과산화지질을 형성함으로써 막의

안정성이 저해되어 나타나는 것²⁾으로 생각되고 있다. 일반적으로 oxygen free radical은 미토콘드리아의 호흡연쇄계,^{3,4)} microsomes의 약물대사효소계^{5,6)} 및 알데히드 옥시다제⁷⁾와 산틴 옥시다제^{8,9)} 등에 의해 생성되어 생체내의 친전자성 물질들을 공격함으로써 동맥경화증,¹⁰⁾ 당뇨병,^{11,12)} 암¹³⁾과 염증^{14,15)} 뿐만 아니라 노화¹⁶⁾ 등을 유발시키는 것으로 알려져 있다.

리도카인과 프로카인아미드는 심근세포에서 sodium의 통로를 차단하여 막전위를 안정화시키는 Class I계로 분류되어 있으며, 프로카인아미드는 활동전압의 길이를 길게 하는 Class IA, 그리고 리도카인은 활동전압기간을 짧게 하는 Class IB계로 모두 amide성 구조를 가진 약물¹⁷⁾로 임상적으로 널리 이용되고 있다.

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 053-810-2812 (팩스) 053-811-3871

최근 Das 등¹⁸⁾은 리도카인과 프로카인아미드 등과 같은 아미드성 항부정맥제가 NADPH 의존성 지질과 산화를 억제시킨다고 보고하고 있어 심근 세포막 sodium 통로의 차단에 의한 부정맥 치료작용 뿐만 아니라 oxygen free radical의 생성 억제 또는 제거를 통한 작용도 부정맥의 치료와 연관될 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 아미드성 구조를 가진 리도카인과 프로카인아미드를 대상으로 하여 이들 약물의 항산화작용을 검토하는 일환으로 간조직 세포질성 산화효소계 의존성, NADPH 의존성과 비의존성 과산화지질의 생성 및 이와 관련된 superoxide radical과 hydroxyl radical의 소거효과에 미치는 영향을 관찰함과 동시에 그 작용기전을 규명하는 일환으로 oxygen free radical 생성계 효소인 알데히드 옥시다제와 산틴 옥시다제의 활성에 미치는 영향을 상호 비교 검토하였다.

실험방법

재료 및 시약 - N¹-methylnicotinamide(NMN), 산틴 옥시다제 등의 모든 시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그외 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

실험동물 처치 - 실험동물은 본 대학 동물사에서 오전 7시에 점종되며 오후 7시에 소동되는 일정한 실내 온도(20±2°C) 및 습도를 유지하는 조건에서 사육한 외관상 건강한 25g 내외의 웅성 ICR mouse를 사용하였다. 0.9% 생리식염수에 용해시킨 리도카인 및 프로카인아미드를 각각 kg당 30 mg의 용량으로 1일 1회 7일간 복강주사하였고, 대조군은 같은 방법으로 생리식염수를 복강으로 주사하였다.

효소원의 조제 - 실험동물을 단두 도살하여 복부 정중선을 따라 개봉한 다음, 병냉의 0.9% 생리식염수로 간장을 관류한후 적출하였다. 적출한 간은 0.1M potassium phosphate buffer(K.P. buffer, pH 7.5) 4배량을 가해 호모게나이저로 마쇄하여 20% 균질액을 만들었다. 마쇄균질액은 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 postmitochondria 분획을 효소원으로 사용하였다.

알데히드 옥시다제의 부분정제 - Huff 등¹⁹⁾의 방법에 준해 마우스 간 조직 마쇄액을 10,000×g에서 30분간

원심분리하여 얻은 postmitochondria 분획을 60°C에서 1시간 열처리한 다음, 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 열변성된 단백질을 제거한 상청액을 취하였다. 이 상청액에 ammonium sulfate를 35~60% 포화시켜 원심분리하여 얻은 pellet을 0.05M K.P. buffer (pH 7.8)에 현탁시킨 다음 병냉의 acetone을 가하여 50% 포화시킨 후 다시 원심분리 하였다. 재원심분리하여 얻은 pellet을 다시 0.05M K.P. buffer(pH 7.8)에 재현탁시켜 투석막속에 넣고, 0.05M K.P. buffer (pH 7.8) 1,000배량의 외액 속에서 12시간 동안 투석시켰다. 이상의 모든 조작은 4°C 이하에서 행하였다.

알데히드 옥시다제의 활성 측정 - 알데히드 옥시다제의 활성 측정은 Rajagopalan 등²⁰⁾의 방법에 준하여 0.1M K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 NMN 및 효소액을 첨가하여 37°C에서 반응시키는 동안 생성된 pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 표준 검량선에 준하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

산틴 옥시다제의 활성 측정 - 산틴 옥시다제의 활성 측정은 Stirpe 등²¹⁾의 방법에 따라 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 산틴 및 효소액을 가하여 37°C에서 반응시키는 동안 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 표준 검량선에 준하여 효소의 활성도를 산정하였다.

Superoxide radical에 의한 과산화지질의 생성 - 간조직 마쇄균질액 일정량에 superoxide radical 생성계인 산틴-산틴 옥시다제계를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 생성된 과산화지질을 Ohkawa 등²²⁾의 방법에 따라 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 95°C 에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol:pyridine(15:1) 혼합액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다.

Fe(II)-ascorbate system을 이용한 과산화지질의 생성 - 간조직 마쇄균질액 일정량에 70 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4), 200 μM FeSO₄, 200 μM ascorbate를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰을 때 생성된 과산화지질의 함량을 Ohkawa²²⁾ 등의 방법으로 측정하였다.

NADPH 의존성 과산화지질의 생성 - 간조직 microsome 일정량에 15 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 0.1 mM NADPH, 2 mM ADP, 10 μM FeCl₃를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰을 때 생성되는 과산화지질의 함량을 Ohkawa²²⁾ 등의 방법으로 측정하였다.

통계처리 - 모든 자료는 mean±S.E.로 나타내었고, Student's t-test로 유의성 검정을 수행하였으며 p<0.05의 수준에서 판정하였다.

실험 결과 및 고찰

정상적인 생체내 대사과정에서 뿐만 아니라 체내로 섭취된 xenobiotics의 대사과정에서 생성되는 oxygen free radical은 간, 심장질환, 당뇨병 및 동맥경화증 등과 같은 대사성 질환을 유발시키고 발암과 노화에도 관여하는 것으로 보고¹³⁾되고 있다.

본 실험에서는 부정맥이 oxygen free radical에 의해 유발²³⁾될 것이라는 보고와 부정맥 치료에 이용¹⁷⁾되는 리도카인과 같은 아미드성 약물이 NADPH 의존성 지질과산화물을 억제한다는 보고를 고려하여 아미드성 물질의 항산화작용 기전을 규명하는 일환으로 *in vitro*에서 과산화 지질의 함량변동 및 oxygen free radical 생성계 효소인 알데히드 옥시다제와 산틴 옥시다제의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

시험관내에서 과산화지질의 생성에 미치는 아미드성 물질의 영향을 관찰하였을 때, 구조가 유사한 리도카인과 프로카인아미드는 과산화지질의 생성을 각각 40%

와 30% 정도 억제시켰으며(Fig. 1), 또한 Fe(II)-ascorbate system을 이용한 NADPH 비의존성 과산화지질 생성의 경우에도 두 약물 모두 정도의 차이는 있으나 현저하게 억제시켰다(Fig. 2). 한편 microsome을 이용한 NADPH 의존성 과산화지질의 생성을 관찰하였을 때도 두 약물 모두 과산화지질의 생성을 억제시켰으나, 억제 정도는 리도카인의 경우 더욱 현저하게 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과로 보아 리도카인과 프로카인아미드는 과산화지질의 생성을 억제시킴으로써 oxygen free radical로부터 생체막을 보호해주는 작용이 있는 것으로 사료된다. 한편 리도카인과 프로카인아미드와 같은 아미드성 물질들의 과산화지질 생성 억제작용은 superoxide radical보다는 hydroxyl radical에 대한 소거효과에 기인할 것이라는 실험결과 는 이미 알려진 바 있으며,¹⁸⁾ 그 실험결과는 생략하였

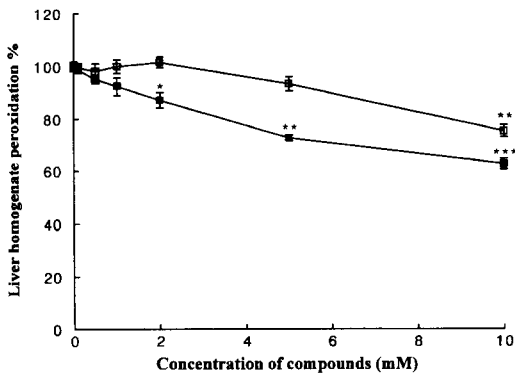


Fig. 1 - Effect of lidocaine and procainamide on superoxide generating system induced lipid peroxidation *in vitro*. ■ : lidocaine, □ : procainamide

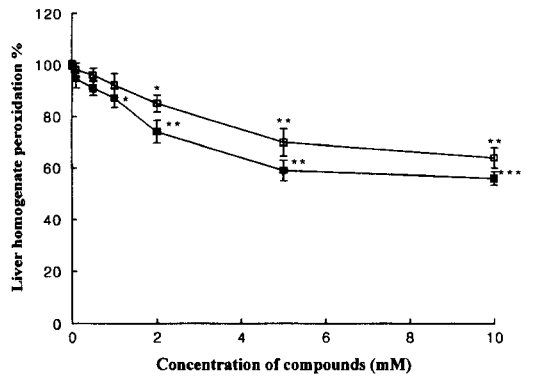


Fig. 2 - Effect of lidocaine and procainamide on Fe(II)-ascorbate system induced lipid peroxidation *in vitro*. ■ : lidocaine, □ : procainamide

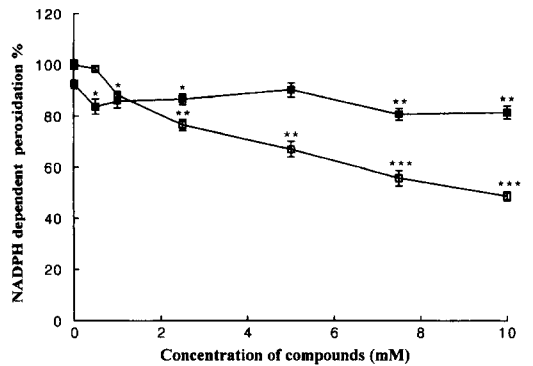


Fig. 3 - Effect of lidocaine and procainamide on NADPH-dependent lipid peroxidation *in vitro*. ■ : lidocaine, □ : procainamide.

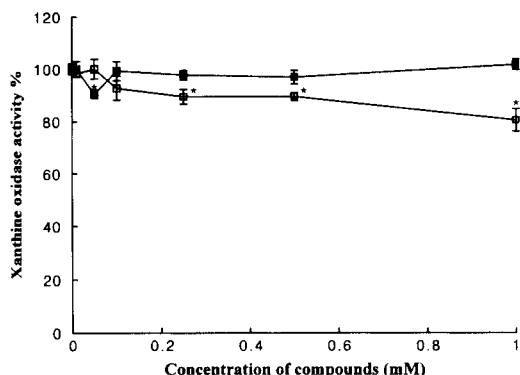


Fig. 4 – Xanthine oxidase inhibiting effect of lidocaine and procainamide *in vitro*
 ■ : lidocaine, □ : procainamide

으나 본 실험에서도 역시 동일한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다.

한편, 리도카인과 프로카인아미드에 의한 과산화지질 생성 억제 작용이 oxygen free radical의 생성계를 억제함으로써 나타나는 것인지를 검토하고자 superoxide radical 뿐만 아니라 hydroxyl radical도 생성시키는 것으로 알려져 있는 산틴 옥시다제^{8,9)}의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였을 때, 두 약물 모두 별다른 활성억제 작용을 나타내지 않았다(Fig. 4). 그리고 또다른 superoxide radical 생성계인 알데히드 옥시다제⁷⁾에 미치는 영향을 검토하였을 때, 리도카인의 경우 현저한 억제작용을 관찰할 수 있었으며, 리도카인보다는 경미하지만 프로카인아미드 역시 상당한 정도의 억제작용을 나타내었다(Fig. 5). 이러한 실험결

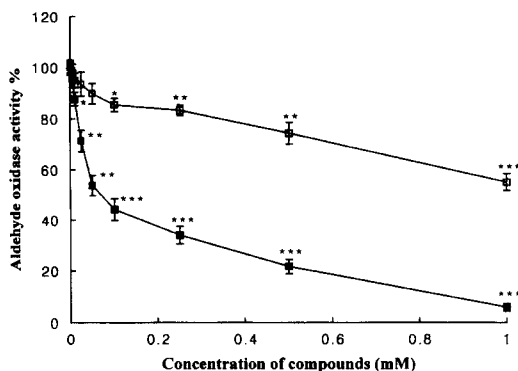


Fig. 5 – Aldehyde oxidase inhibiting effect of lidocaine and procainamide *in vitro*.
 ■ : lidocaine, □ : procainamide

과와 hydroxyl radical이 Fe²⁺ 존재하에서 superoxide와 hydrogen peroxide가 Fenton 반응²⁴⁾을 통하여 생성되는 oxygen free radical이란 사실 등을 종합해 볼 때, 리도카인 및 프로카인아미드와 같은 아미드성 약물은 superoxide와 hydroxyl radical을 생성시키는 효소인 알데히드 옥시다제의 활성을 억제함으로써 oxygen free radical인 superoxide의 생성을 억제시킬 뿐만 아니라 과잉의 superoxide와 과산화수소가 반응하여 생성될 수 있는 hydroxyl radical을 직접 제거시킴으로써 과산화지질의 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

리도카인에 의한 알데히드 옥시다제의 활성 저해 현상이 어떠한 작용기전에 의해 나타나는가를 검토하기 위하여 부분 정제시킨 마우스 간 세포질성 알데히드 옥시다제의 기질인 NMN의 농도를 변화시켜가면서 관찰하였을 때, 리도카인을 첨가시킨 경우 k_m치의 변동은 없었으나, V_{max}치가 리도카인을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 현저히 감소됨을 보였다. 따라서 리도카인은 알데히드 옥시다제에 대하여 효소와 기질간의 친화력에는 유의성 있는 영향을 미치지 않으나, 효소의 기질결합부위가 아닌 다른 부위에 영향을 미침으로써 비경쟁적 저해현상을 나타내는 것으로 사료된다(Fig. 6, Table I).

In vitro 실험에서 강한 저해활성을 보인 리도카인과 프로카인아미드를 mouse에 7일간 복강주사하여 알데히드 옥시다제의 활성을 실험한 결과, 두가지 약물 모두 대조군에 비해 약 25%정도의 유의성있는 감소를 나타내어 *in vivo*에서도 역시 저해효과가 있음을 확인

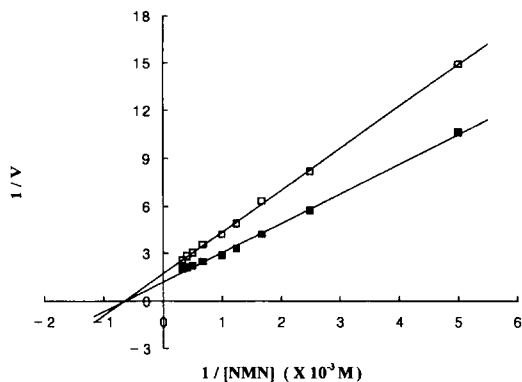


Fig. 6 – Lineweaver-Burk plots of the partially purified hepatic aldehyde oxidase with lidocaine (50 μM).
 ■ : control, □ : lidocaine

Table I – Effect of lidocaine on aldehyde oxidase activity

	V_{max}	K_m
Aldehyde oxidase with lidocaine	3.40 M/min	1.56 mM
Aldehyde oxidase alone	4.88 M/min	1.56 mM

Calculated by Lineweaver-Burk equation.

Concentration of lidocaine was 50 μ M and substrate for aldehyde oxidase was N¹-methylnicotinamide. Purified aldehyde oxidase was obtained from mouse liver. Experiment was performed at 37°C.

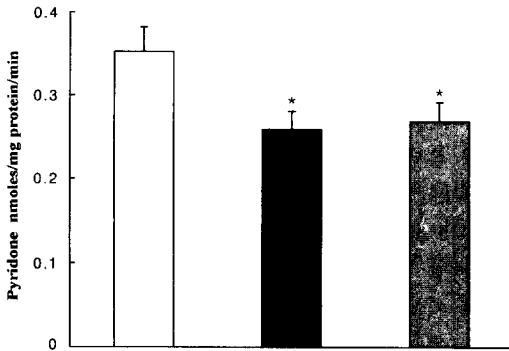


Fig. 7 - Effect of lidocaine and procainamide on hepatic aldehyde oxidase activity *in vivo*. Mice were injected lidocaine or procainamide (30 mg/kg, i.p.) for 7 days. The assay procedure was described in the experimental methods. Vertical brackets at point indicate mean \pm S.E. with 8 animals in each group. *: significantly different from control ($p < 0.05$)

□ : control, ■ : lidocaine, ▨ : procainamide

할 수 있었다(Fig. 7).

이상의 모든 실험성과 문헌상의 지견을 종합하여 볼 때, 리도카인과 프로카인아미드는 대표적인 oxygen free radical 생성계 효소중의 하나인 알데히드 옥시다제 활성을 억제시키는 정도가 높았으며, 이는 부분적으로 리도카인과 프로카인아미드의 항산화작용에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 이러한 아미드성 물질 자체가 hydroxyl radical을 직접 소거시키는 항산화 작용을 나타냄으로써,¹⁸⁾ oxygen free radical과 관련되어 나타나는 부정맥, 간질환, 당뇨병 및 동맥경화증 등과 같은 여러 질병의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 기대된다.

문 헌

- 1) 김학성, 허 근 : 임상약리학, 고문사, p. 55 (1986).
- 2) Chio, K. S. and Tappel, A. L. : Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry*, **8**, 2821 (1969).
- 3) Boveris, A. and Chance, B. : The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. : General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707 (1973).
- 4) Nohl, H. and Jordan, W. : The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.* **111**, 203 (1980).
- 5) Freeman, B. A. and Crapo, J. D. : Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412 (1982).
- 6) Trush, A. M., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E. : Activation of pharmacologic agents to radical intermediates: Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3335 (1982).
- 7) Messey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G. and Engel, P. C. : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 891 (1969).
- 8) Battelli, M. G., Lorenzoni, E. and Stripe, F. : Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase): Purification, interconversion and some properties. *Biochem. J.* **131**, 191 (1973).
- 9) Granger, D. N. and Parks, D. A. : Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. *The Physiologist.* **26**, 159 (1983).
- 10) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. : Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Eng. J. Med.* **320**, 915 (1989).
- 11) Sato, Y., Hotta, N., Sakamoto, N., Masuoka, S., Ohishi, N. and Yaki, K. : Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.* **21**, 104 (1979).
- 12) Wolf, S. P. and Dean, R. T. : Glucose autoxidation and protein modification. : The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem. J.* **245**, 243 (1987).
- 13) Pryor, W. A. : *Involvement of Radical Reactions in Aging and Carcinogenesis in Medical Chemistry*,

- Elservier, Amsterdam, p. 331 (1977).
- 14) Guyan, P. M., Uden, S. and Braganza, J. M.: Heightened free radical activity in pancreatitis. *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 347 (1990).
 - 15) Schoenberg, M. H., Buchler, M. and Beger, H. G.: The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Free Rad. Biol. Med.* **12**, 515 (1992).
 - 16) Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moderman, E. J., Goldstein, S. and Stadtman, E. R.: Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5488 (1987).
 - 17) Bigger, J. T. Jr., and Hoffman, B. F.: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 7th ed., Macmillan Publishing Co., New York, p. 748 (1985).
 - 18) Das, K. and Misra, H. P.: Antiarrhythmic agents.: Scavengers of hydroxyl radicals and inhibitors of NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine lung microsomes. *J. Biol. Chem.* **267**, 19172 (1992).
 - 19) Huff, S. D. and Chaykin, S.: Kinetics of testosterone action, *in vivo*, on liver N¹-methylnicotinamide oxidase activity in mice. *Endocrinol.* **83**, 1259 (1968).
 - 20) Rajagopalan, K. V.: *Enzymatic Basis of Detoxication*. Vol. 1, Academic Press, New York, p. 295 (1980).
 - 21) Stirpe, F. and Dilla Corte, E.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **244**, 3855 (1969).
 - 22) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
 - 23) Arroyo, C. M., Kramer, J. H., Dickens, B. F. and Weglicki, W. B.: Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett.* **221**, 101 (1987).
 - 24) Winterbourn, K. C. and Sutton, H. C.: Iron and xanthine oxidase catalyze formation of an oxidant species distinguishable from OH.: Comparison with the Haber-Weiss reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 27 (1986).