

## 막지질 과산화와 간세포내 마이크로솜 및 리덕타제 기능과의 상관성에 관한 연구

박상열\* · 조종후

전북대학교 수의과대학 생체안정성연구소  
(개재승인: 2004년 4월 22일)

### Effect of membrane lipid peroxidation on rat liver microsomal enzyme activity

Sang-Youel Park\* and Jong-Hoo Cho

Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,  
Jeonju 561-756, Korea  
(Accepted: April 22, 2004)

**Abstract :** The effects of membrane lipid peroxidation and retinyl palmitate on rat liver microsomal functions were investigated *in vitro*. Rat liver homogenates exposed to oxygen tension for 0, 3, 6, 9 or 12 hours and lipid peroxidation levels were evaluated by the measurements of fluorescence intensity, malondialdehyde (MDA) and retinyl palmitate. The fluorescence intensity of homogenates and microsomes were elevated and retinyl palmitate concentrations were decreased. But the concentration of MDA was not affected to exposure time. Therefore, fluorescence intensity and retinyl palmitate concentration were used to analyze the correlation between lipid peroxidation and microsomal functions. To investigate the liver microsomal functions, the microsome was isolated from rat liver homogenates exposed to oxygen. The concentration of cytochrome P450 and the activity of NADPH-cytochrome P450 reductase in liver microsomes were gradually decreased with increasing the exposure time. The correlation between fluorescence intensity of microsomes showed a very high inverse correlation of -0.97 and -0.93, respectively. The decrease of cytochrome P450 concentration was due to the regeneration of cytochrome P450 to cytochrome P420. Also, the activities of cytochrome P450-dependent aminopyrine demethylase and benzpyrene hydroxylase of liver microsomes were gradually decreased with increasing the exposure time. The correlation with fluorescence intensity of microsome showed a high inverse correlation of -0.97 and -0.91, respectively. The retinyl palmitate concentrations of rat liver homogenates were decreased with increasing the exposure time. The decrease of retinyl palmitate concentration was followed by a low concentration of cytochrome P450 and activity of NADPH-cytochrome P450 reductase. The correlation indicated high direct correlation of 0.92 and 0.93, respectively. The decrease of retinyl palmitate concentration was also accompanied by the reduction of aminopyrine demethylase and benzpyrene hydroxylase activities. The correlation was analyzed a high direct correlation of 0.90 and 0.85, respectively. In conclusion, these studies have shown that the membrane lipid peroxidation of rat liver microsome proportionally decreased microsomal enzyme activities *in vitro* experiments.

**Key words :** microsome, retinyl palmitate, malondialdehyde, cytochrome P450

이 논문은 2003년도 전북대학교 생체안정성연구소의 일부 지원으로 연구되었음

\*Corresponding author: Sang-Youel Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea  
[Tel: 82-63-270-3886, Fax: 82-63-270-3780, E-mail: sypark@chonbuk.ac.kr]

## 서 론

동물체의 세포와 세포 소기관들의 막은 주로 불포화 지방산으로 구성된 인지질 이중층 사이에 단백질이 내재하거나 또는 막표면에 노출되어 측면 단백질, 방어 단백질 또는 이온 수송계로서의 역할을 하고, 불포화 지방산은 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의하여 쉽게 산화되어 지질 과산화물을 생성하며 주변 조직의 손상과 변성을 초래하여 세포 기능을 손상시킨다 [2, 6].

노화의 주요 요인 중에 하나인 반응성 산소종에 의해 생성된 지질 과산화물은 봉괴되어 malondialdehyde (MDA) 또는 4-hydroxynonenal과 같은 aldehyde 류를 생성하며 [3, 6], 2차적으로 세포내 아미노기를 가지고 있는 인지질, 단백질 또는 헥산과 같은 물질과 결합하여 거대분자를 생성하며, 특히 헥산과 결합할 때는 돌연변이를 유발하여 암을 일으킬 수 있다고 보고되었다 [4, 13].

세포내의 소포체는 약품·농약과 같은 유해물질 및 지질들을 수용성 물질로 전환시키는 해독 효소계인 mixed function oxygenases (MFO) 시스템을 가지고 있으며 지질 생합성에 관여하는 중요한 소기관으로, 세포를 파쇄하여 분리한 소포체의 입자를 마이크로솜 (microsome)이라고 한다. 마이크로솜의 MFO 시스템은 NADPH로부터 전자를 전달하여 cytochrome P450을 활원시킴으로써 이미 결합된 지용성 유기화합물에 산소를 제공하여 hydroxyl기를 갖는 수용성 물질로 전환시켜 체외로의 배설을 용이하게 한다 [7, 12]. 이러한 전자전달과 산소의 사용과정에서 ROS들이 마이크로솜에서 생성되어 막지질 과산화를 유발시키는 사실이 시험관내 실험에서 확인되었으며 [9, 11, 17], 생체실험에서도 막지질 과산화에 의한 마이크로솜 기능 변화에 대한 보고가 있다 [1, 8, 16]. 생체에서 ROS는 계속하여 생성되며, 이러한 ROS에 의한 막지질 과산화가 진행되기 때문에 생체의 건강유지를 위하여 막지질 과산화가 소기관들의 고유기능에 미치는 영향을 규명하는 것은 매우 중요하다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 뱃드 간세포 균질액을 일정 산소압하에서 막지질 과산화를 유도시킨 후 마이크로솜을 분리하여 막지질 과산화 수준을 MDA 측정법과 형광분석법으로 평가하였으며, 이에 수반되는 마이크로솜 기능의 평가를 위하여 MFO 시스템의 핵심 물질인 cytochrome P450 양과 cytochrome P450 reductase 활성을 평가하였다. 아울러 실제로 화합물의 대사능력을 평가하기 위하여 cytochrome P450 의존 aminopyrine demethylase 활성과 benzpyrene hydroxylase 활성을 측정하였으며, 막지질 과산화에 의한 형광물질의 생성과 retinyl palmitate 농도 변화와의 관계도 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

이유 직후의 Sprague-Dawley계 수컷 뱃드 30마리를 전북대학교 생체안정성연구소에서 분양받아 삼양사료(주)에서 제조한 마우스 사료를 물과 함께 제한없이 급여하면서 실험동물실에서 사육하였다. 약 4개월 사육 후 체중 약 250 g 전후에 도달하였을 때 두부를 타격하여 치사시킨 후 간을 채취하여 실험에 사용한다.

### 분석시약 및 분석기기

마이크로솜의 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome c reductase 활성 측정을 위한 1,2,4-aminonaphthal sulfonic acid, cytochrome c 및 NADPH와 마이크로솜의 약물 대사측정을 위한 aminopyrine과 benzpyrene은 Sigma (U.S.A.) 제품을 사용하였고, malondialdehyde 측정을 위한 thiobarbituric acid (TBA)와 trichloroacetic acid (TCA)는 Lancaster (England)제품, 기타 일반 시약은 Junsei (Japan) 제품의 1급 시약을 사용하였다.

분석기기로 균질마쇄기는 SMT process homogenizer (SMT Co., Japan)와 teflonpestle homogenizer (Wheaton, U.S.A.)를 사용하였고, 마이크로솜의 분리를 위해서는 super speed centrifuge (Vision, Korea)를 사용하였으며, 흡광도 측정은 UV-2100 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 사용하였고, 형광 스펙트럼과 형광강도의 측정은 spectrofluorometer (SFM25, Italy)를 사용하였다.

### 간세포 마이크로솜의 분리

뱃드를 치사시킨 후 즉시 간장을 제거하여 세척하고 냉장 Tris 완충액 (0.25 M sucrose, 20 mM nicotinamide, 27 mM KCl, pH 7.4)으로 3회 이상 세척하여 결체조직과 응고된 혈액을 제거하였다. 세척한 조직에 다시 같은 Tris 완충액 30 ml를 가하여 SMT process homogenizer로 1분간 조직을 파쇄 시킨 후 다시 teflon-pestle homogenizer를 사용하여 0-4°C를 유지하면서 4회 stroke를 실시하여 균질 부유액을 실험에 사용하였다. 마이크로솜의 분리는 균질 부유액으로부터 미토콘드리아를 분리하여 제거하고 Omura와 Sato [15]의 방법에 준하여 마이크로솜을 분리하였다. 전 과정을 요약하면 균질 부유액을 460×g에서 5분간 원심분리하여 세포 파쇄물과 혈침전물을 분리하여 제거하고 상청액을 다시 4,300×g에서 10분간 원심분리하여 미세한 파쇄물 침전을 제거하였다. 얻어진 상청액을 12,500×g에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전물을 분리하여 제거한 후 얻어진 상청액을 100,500×g에서 90분간 원심분리하여 마이크로솜 침전물을 분리하였다. 마이크로솜 침전물을 Tris

완충액에 부유시켜 다시 한번 teflon-pestle homogenizer를 사용하여 마이크로솜 균질 부유액을 얻었다. 위와 같이 얻어진 간 균질액과 마이크로솜 부유액은 단백질 농도를 측정하여 필요에 따라 즉시 적절한 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 부득이 보관할 필요가 있을 때는 냉동 보관하여 3일 이내에 실험에 사용하였다.

#### 막지질 과산화 수준의 측정

##### (1) Malondialdehyde (MDA)의 측정

Keller 등 [10]의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. TBA 시약 (15% TCA, 0.375% TBA, 0.25 N HCl) 2 ml와 균질액 또는 마이크로솜 부유액 (1 mg protein/ml) 1 ml, 그리고 10  $\mu$ l의 10% BHT를 가하여 혼합하고 자비 수조에서 15분간 가열한 후 냉각시킨 반응액을 3,000  $\times g$ 에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액의 형광강도를 여기파장 (Ex., Excitation wavelength) 515 nm와 방사파장 (Em., Emission wavelength) 553 nm에서 측정하였다. 표준품으로 tetramethoxy propane을 상기와 같은 방법으로 처리하여 얻은 MDA 표준 형광곡선으로부터 MDA 양을 산출하였다.

##### (2) 형광강도의 측정

간 균질액과 마이크로솜 부유액을 Tris 완충액으로 희석하여(2 mg protein/ml) Ex. 342 nm와 Em. 455 nm에서 상대적 형광강도를 측정하여 비교하였다.

#### Retinyl palmitate 측정

균질액중의 retinyl palmitate 농도는 Szweda [18]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 간 균질 희석액 (6 mg protein/ml 용액 50  $\mu$ l)에 methanol 1 ml를 가하여 잘 혼합한 후 1000  $\times g$ 에서 5분간 원심 분리하였다. 상청액 1 ml에 methanol 2 ml를 가하여 혼합, 3배로 희석해서 Ex. 330 nm와 Em. 471 nm에서 상대적 형광강도를 측정하고 표준 retinyl palmitate를 처리하여 작성한 표준 형광곡선으로부터 균질액 1 ml (1 mg protein 함유) 당 retinyl palmitate 양을 산출하였다.

#### マイ크로솜 활성의 측정

##### (1) Cytochrome P450 측정

마이크로솜 부유액 중 cytochrome P450 양은 Omura 와 Sato [15]의 방법으로 측정하였다. 즉, 마이크로솜 부유액 (2 mg protein/ml, 0.15 M KPO<sub>4</sub> 완충액) 5 ml에 sodium dithionite를 소량 가하고 잘 혼합하여 2.5 ml 씩 두 개의 비색관에 나누어 넣고 한쪽 비색관에 일산화탄소를 포화시켜 그렇지 않은 비색관을 대조로하여 파장 380 nm와 500 nm 사이의 흡광 스펙트럼을 작성하였다.

450 nm와 490 nm에서의 흡광도 차이로부터 cytochrome P450의 extinction coefficient, 91 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 이용하여 농도를 산출하였다(nmol cytochrome P450/mg protein).

##### (2) NADPH-cytochrome c reductase 활성 측정

마이크로솜 부유액 NADPH-cytochrome c reductase 활성은 cytochrome c 용액 (5 mg cytochrome c/ml, 0.3 M 인산완충액, pH 7.5) 0.2 ml에 0.3 M 인산완충액 0.8 ml, 9.5 mM NADPH 10  $\mu$ l, 마이크로솜 부유액 (5 mg protein /ml) 10  $\mu$ l를 1 ml 비색관에서 혼합하여 1분 후 파장 550 nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정하였다. 1분간의 흡광도 변화로부터 환원 cytochrome c의 extinction coefficient, 21  $\times$  10<sup>3</sup>  $\mu$ mol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein을 이용하여 환원되는 cytochrome c의 nm/min/mg protein으로 활성을 표시하였다.

##### (3) Aminopyrine N-demethylase 활성 측정

Wills [20]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 0.05 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 3 ml, 마이크로솜 부유액 (5 mg protein/ml) 1 ml, 9.5 mM NADPH 20  $\mu$ l, 그리고 0.1 M aminopyrine 1 ml를 혼합하여 37°C의 수조에서 반응시키면서 5분 간격으로 4회에 걸쳐 반응액 1 ml 씩 취하여 10% TCA 1 ml와 혼합하였다. 혼합액을 실온에서 15분간 방치한 후, Nash 시약 [14] 2 ml와 혼합하여 60°C 항온수조에서 15분간 반응시킨 후 2,500 r.p.m.에서 15분간 원심분리하여 상층액의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하였다. 효소에 의하여 생성된 formaldehyde 양을 표준곡선으로부터 산출하여 활성을 생성 formaldehyde  $\mu$ mol/min/mg protein으로 표시하였다.

##### (4) Benzpyrene hydroxylase 활성 측정

Watanabe 등 [19]의 방법에 준하여 측정하였다. 요약 하면, 마이크로솜 부유액 (2.5 mg protein/ml) 0.2 ml, 0.05 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 0.8 ml, 9.5 mM NADPH 10  $\mu$ l, 그리고 0.01 M benzpyrene-acetone 용액 10  $\mu$ l를 잘 혼합한 후, 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 acetone 1 ml를 첨가하고, 다시 hexane 3 ml를 첨가하여 10분간 추출하였다. Hexane 1 ml를 취하여 1 N NaOH 3 ml와 혼합하고 1분간 전탕하여 4,000 r.p.m.에서 5분간 원심분리하였다. NaOH 층을 분리하여 Ex. 396 nm, Em. 522 nm에서 산화된 benzpyrene의 형광강도를 측정하였다. 활성도는 산화된 benzpyrene의 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

#### 통계학적분석

본 실험에서 얻어진 실험 관측치는 5회 반복실험의

평균±표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 Student t-검정에 의하였으며, 상관분석법에 의하여 회귀방정식과 상관계수( $r$ )를 구하였다.

## 결 과

간 균질액의 산소처리가 간 균질액 및 마이크로솜의 막지질 과산화수준과 retinyl palmitate 농도에 미치는 영향

### (1) 형광강도의 변화

간 균질액 및 마이크로솜 부유액에서 형광스펙트럼의 차이가 있는지를 확인하기 위하여, 각각 2 mg protein/ml로 희석하여 작성한 Ex. 342 nm에서의 형광스펙트럼은 Fig. 1과 같이 모두 Em. 455 nm에서 형광 peak를 나

타내었다. 따라서 지질 과산화에 따른 형광강도의 변화는 Ex. 342 nm와 Em. 455 nm에서 측정하여 비교하였다.

간 균질액을 산소압하에 30°C 수조에서 진탕하면서 3시간 간격으로 12시간까지 5회에 걸쳐 채취하여 마이크로솜을 분리한 후 단백질 2 mg/ml을 함유하도록 희석한 간 균질액과 마이크로솜 부유액의 상대적 형광강도를 측정한 바, Fig. 2와 같았다. 간 균질액과 마이크로솜 부유액 모두에서 12시간까지 형광 강도가 증가하였음을 알 수 있었다.

### (2) MDA 함량 변화

산소를 처리한 간 균질액과 그 균질액에서 제조한 마이크로솜 부유액의 MDA 함량의 변화는 Fig. 3과 같았다. 간 균질액의 MDA 함량은 3시간 이내에 증가하였으

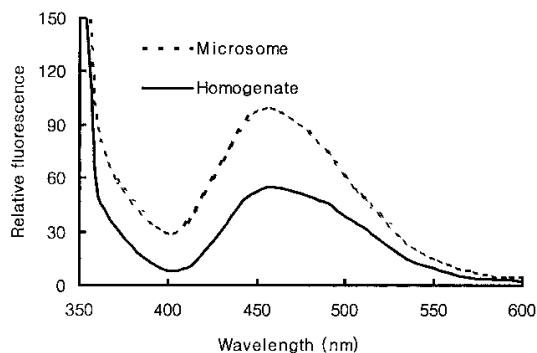


Fig. 1. Fluorescence spectra of homogenates and microsomes from rat liver homogenates exposed to oxygen tension. Emission spectra excite at 342 nm were recorded.

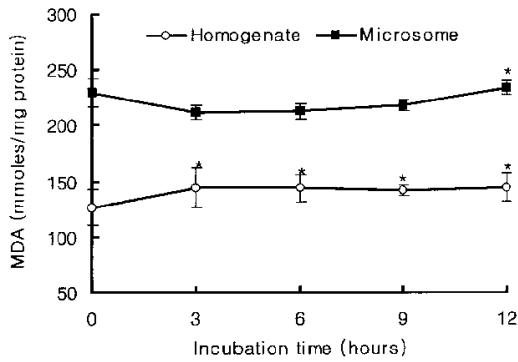


Fig. 3. Malondialdehyde concentration of homogenates and microsomes from rat liver homogenates exposed to oxygen tension. Each value is the mean $\pm$ SD for 5 repeated experiments. \*P<0.05 vs. 0 hour.

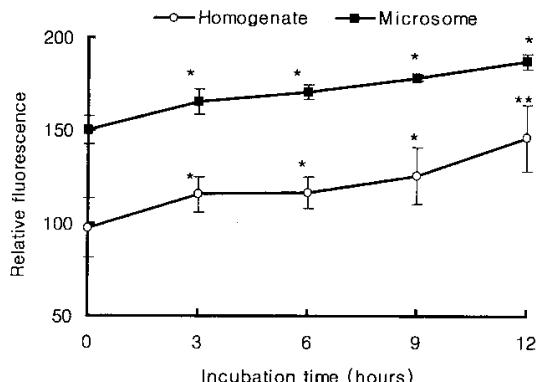


Fig. 2. Relative fluorescence of homogenates and microsomes from rat liver homogenates exposed to oxygen tension. Each value is the mean $\pm$ SD for 5 repeated experiments. \*P<0.05 vs. 0 hour, \*\*P<0.01 vs. 0 hour.

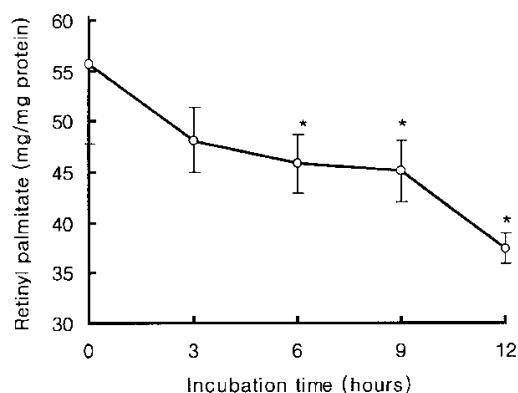
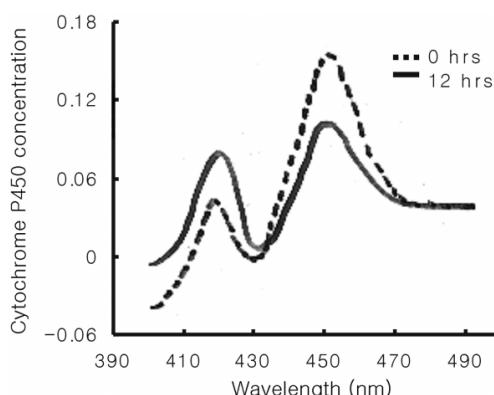


Fig. 4. Effect of incubation time on hepatic retinyl palmitate concentration in homogenates exposed to oxygen tension. Each value is the mean $\pm$ SD for repeated experiments. \*P<0.05 vs. 0 hour.



**Fig. 5.** The spectrum changes of microsomal cytochrome P450 from rat liver homogenates exposed to oxygen tension.

며 이후 변함없이 동일한 수준을 유지하였다. 마이크로솜 부유액에서는 12시간 후에 다소 상승한 것을 제외하고는 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.

### (3) Retinyl palmitate 농도 변화

생체에서 막지질 과산화가 진행되면서 retinyl palmitate 가 증가하였다는 보고에 따라 간 균질액을 산소로 처리하여 retinyl palmitate 농도의 변화를 조사한 바 Fig. 4와 같았다. 산소 처리 시간에 따라 균질액에서 모두 retinyl palmitate의 농도가 감소하기 시작하여 처리시간이 길어짐에 따라 계속 감소하였다.

### 산소에 의한 막지질 과산화수준과 retinyl palmitate 농도 변화가 마이크로솜 기능에 미치는 영향

#### (1) 마이크로솜 형광강도 변화가 MFO 시스템에 미치는 영향

마이크로솜의 막지질 과산화에 따른 형광강도의 증가가 MFO 시스템의 핵심물질인 cytochrome P450 자체에 미치는 영향을 조사하고자 cytochrome P450의 스펙트럼을 작성하여 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 산소 처리는 파장 450 nm peak를 나타내는 cytochrome P450의 감소와 함께 파장 420 nm peak를 나타내는 cytochrome P420으로의 전환을 보여주었으며, 이는 cytochrome P450이 산소에 의하여 파괴되지 않고 cytochrome P420으로 변성되는 것을 의미한다.

산소처리시간에 따른 마이크로솜 부유액 cytochrome P450의 양과 cytochrome P450에 전자를 전달하는 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성의 변화는 Fig. 6A와 같다. Cytochrome P450 양과 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성 모두 산소처리 시간이 경과함에 따라 12

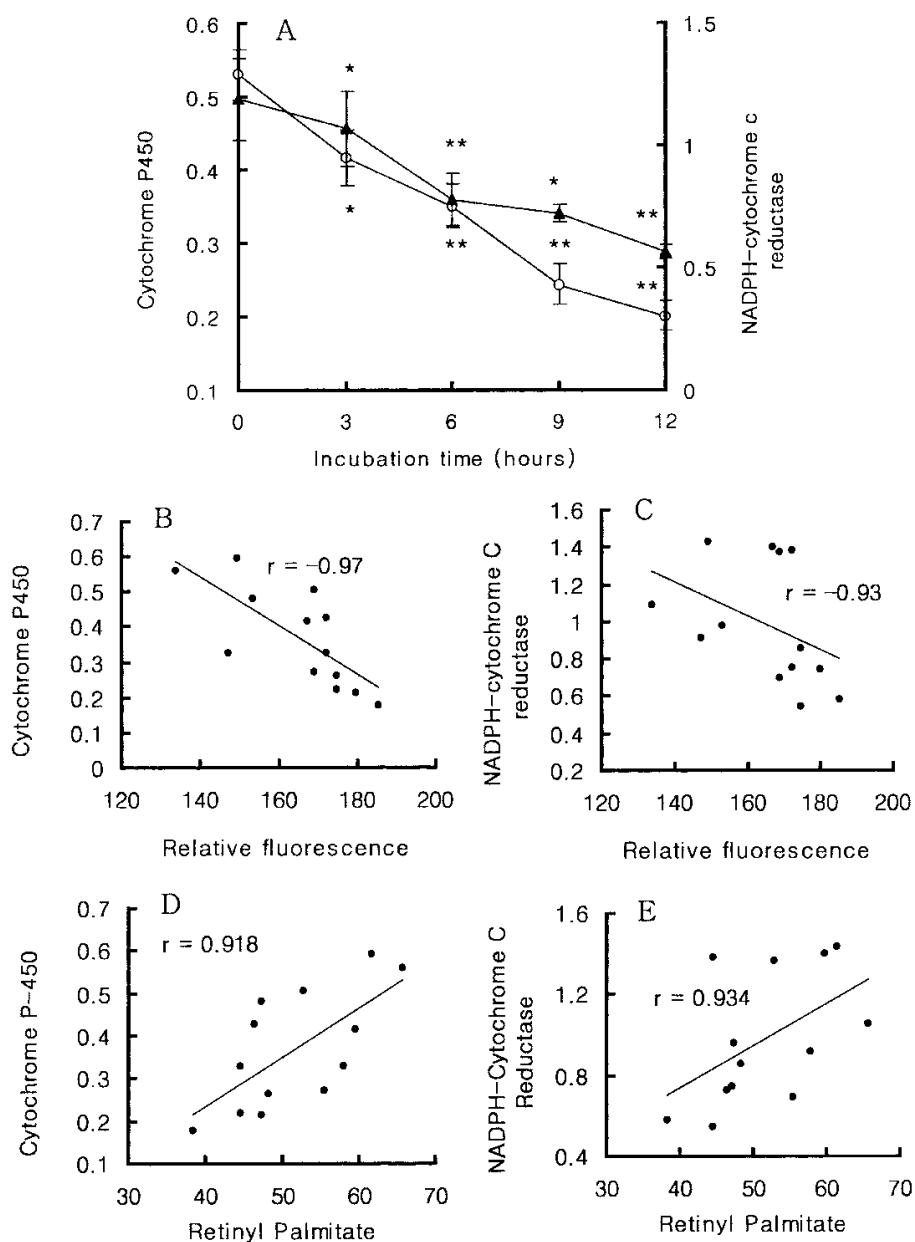
시간 동안 계속 동반 감소하였다. 마이크로솜 부유액의 형광강도 증가와 cytochrome P450 양 및 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성과의 상관성을 조사한 바 Fig. 6B 및 Fig. 6C와 같았다. 마이크로솜 부유액의 형광강도가 증가함에 따라 cytochrome P450 양과 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성 모두 감소하여 cytochrome P450 양과의 상관계수는  $r=-0.97$ , NADPH-cytochrome P450 reductase 활성과의 상관계수는  $r=-0.93$ 의 매우 높은 역상관성을 나타내었다.

간 균질액에 산소를 처리한 결과 retinyl palmitate 농도가 감소하고 MFO 시스템 중 마이크로솜의 cytochrome P450 양과 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성이 감소되었으므로 서로 상관성 유무를 조사하여 Fig. 6D와 Fig. 6E의 결과를 얻었다. 즉, retinyl palmitate 농도 감소는 cytochrome P450 양의 동반 감소 경향을 보였으며,  $r=0.92$ 의 높은 정상관성을 보였다. NADPH-cytochrome P450 reductase 활성도  $r=0.93$ 으로 retinyl palmitate 농도 감소와 함께 크게 저하되는 정상관성을 나타내었다.

#### (2) 마이크로솜 형광강도 변화가 aminopyrine N-demethylase 및 benzpyrene hydroxylase 활성에 미치는 영향

간 균질액에 산소를 처리하여 3시간 간격으로 12시간 까지 5회에 걸쳐 측정한 마이크로솜의 cytochrome P450 의존 aminopyrine N-demethylase 활성과 cytochrome P450 의존 benzpyrene hydroxylase 활성의 변화는 Fig. 7A와 같다. 두 효소 모두 산소처리 시간이 길어짐에 따라 활성이 저하하였으며 benzpyrene hydroxylase의 활성이 보다 더 뚜렷한 저하를 보였다. 간 균질액에 산소를 처리하여 마이크로솜의 형광강도가 증가하였으므로 형광강도의 증가와 cytochrome P450-의존 효소 활성 감소 간의 상관성을 조사한 바 Fig. 7B 및 Fig. 7C와 같았다. Aminopyrine N-demethylase 활성 및 benzpyrene hydroxylase 활성은 마이크로솜의 형광강도의 증가에 반하여 감소하였으며 각각  $r=-0.97$ 과  $r=-0.91$ 의 높은 역상관을 나타내었다.

간 균질액의 산소처리에 의한 간 균질액의 retinyl palmitate 농도 감소와 마이크로솜의 aminopyrine N-demethylase 활성 및 benzpyrene hydroxylase 활성 감소 간의 상관성을 조사한 바 Fig. 7D 및 Fig. 7E와 같았다. 산소에 의한 간 균질액 중 retinyl palmitate 농도의 감소는 마이크로솜 부유액의 aminopyrine N-demethylase 활성과 benzpyrene hydroxylase 활성을 저하시켜 각각  $r=0.90$  및  $r=0.85$ 으로 매우 높은 정상관성을 나타내었다.

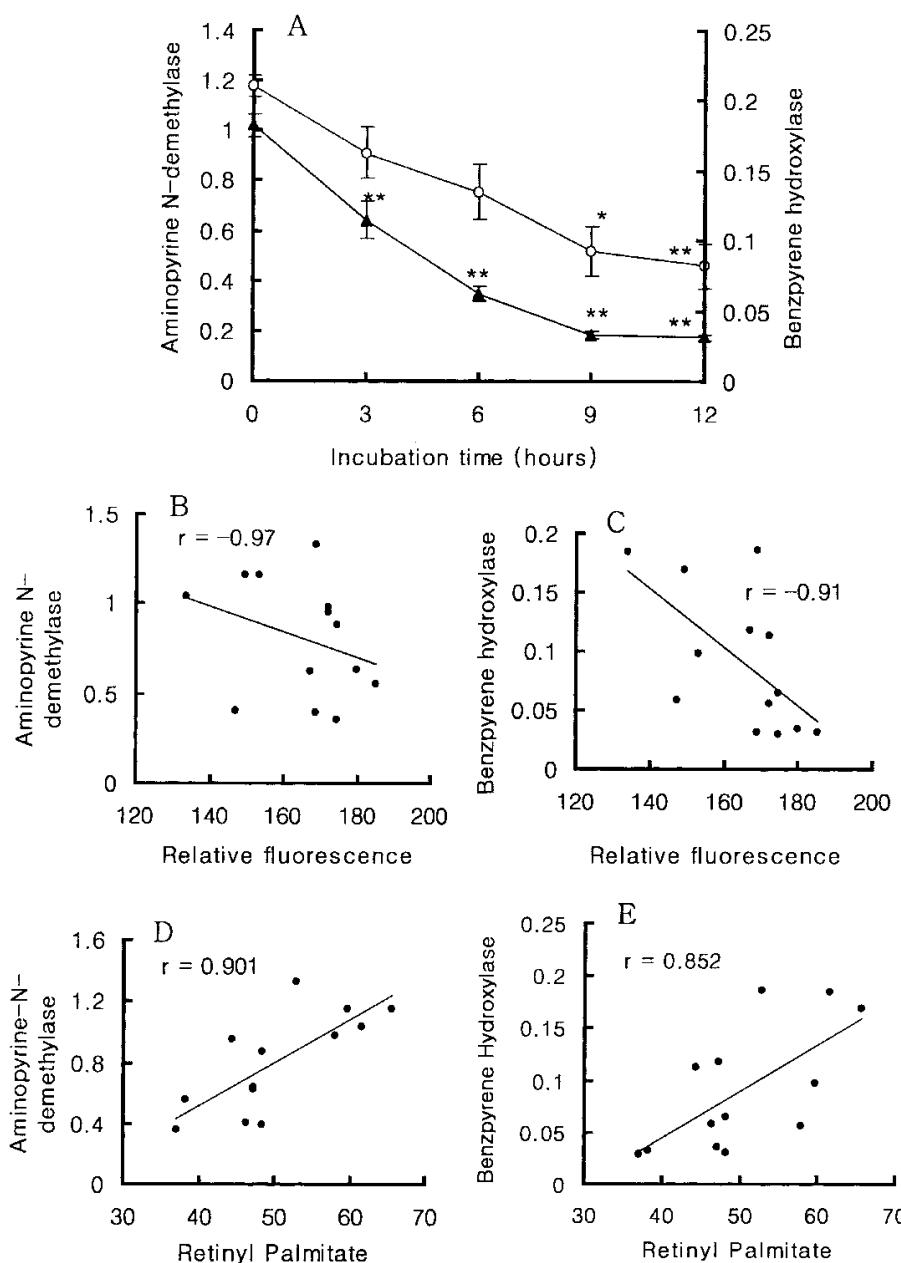


**Fig. 6.** A, Cytochrome P450 concentration and NADPH-cytochrome c reductase activity of microsomes from rat liver homogenates exposed to oxygen tension. Relationship between B, relative fluorescence and cytochrome P450 concentration, C, relative fluorescence and NADPH-cytochrome c reductase activity, D, retinyl palmitate concentration and cytochrome P450 concentration, E, retinyl palmitate concentration and NADPH cytochrome c reductase activity of microsomal suspension from rat liver homogenates exposed to oxygen tension. Each value is the mean $\pm$ SD for 5 repeated experiments. \*P<0.05 vs. 0 hour, \*\*P<0.01 vs. 0 hour.

## 고      찰

간 균질액의 산소처리는 마이크로솜 부유액의 형광강

도를 증가시켰으나, 균질액 중 retinyl palmitate 농도를 감소시켜 지질 과산화에 따른 형광성물질의 생성과 달리 같은 형광성 물질인 retinyl palmitate는 실질적으로



**Fig. 7.** A, Aminopyrine N-demethylase activity and benzpyrene hydroxylase activity of microsomes prepared from rat liver homogenates of oxygen incubations. Relationship between B, relative fluorescence and aminopyrine N-demethylase activity, C, relative fluorescence and benzpyrene hydroxylase activity, D, retinyl palmitate concentration and aminopyrine N-demethylase activity, E, retinyl palmitate concentration and benzpyrene hydroxylase activity of microsomal suspension from rat liver homogenates exposed to oxygen tension. Each value is the mean $\pm$ SD for 5 repeated experiments. \* $P<0.05$  vs. 0 hour, \*\* $P<0.01$  vs. 0 hour.

파괴되는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 시험관 내 산소처리에 의한 간 균질액의 형광강도와 retinyl

palmitate 농도 그리고 마이크로솜 기능 사이의 상관관계를 알아보고자 하였다.

마이크로솜의 MFO 시스템은 해독기전을 수행하며, 핵심이 되는 전자수용체는 cytochrome P450이고 전자수용을 촉매하는 효소는 NADPH-cytochrome P450 reductase이다. 따라서 본 연구에서 산소처리에 의한 형광강도의 변화와 cytochrome P450 양 및 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성 간의 상관성을 조사한 결과 cytochrome P450 양과 NADPH-cytochrome P450 reductase 활성 모두 형광강도의 증가에 수반하여 감소하는 역상관의 관계를 나타내었다. 이러한 결과는 Gut 등 [5]의 보고에서 막지질 과산화의 유도는 cytochrome P450 양을 감소시켰다는 결과와 일치하는 것이었다. NADPH-cytochrome P450 reductase의 활성도 cytochrome P450의 변성에 의하여 또는 효소자체의 변성에 따라 저하되는 것으로 생각된다. Cytochrome P450 양의 감소는 변성에 의하여 cytochrome P420으로 전환되는 것으로 확인되었으며 Karuzina와 Archakov [9]의 보고에서 과산화수소에 의한 막지질 과산화 유도는 cytochrome P450을 파괴하여 감소되었다는 내용과는 다른 것이었다. 아울러 직접 약물을 대사하는 cytochrome P450-의존 aminopyrine N-demethylase와 benzpyrene hydroxylase의 활성도 산소처리에 의한 지질 과산화 수준이 증기함에 따라 저하되어 역상관의 관계를 나타내었다. 이러한 결과는 실험적 막지질 과산화유도는 약물대사를 억제 시켰다는 Wills 등 [20]의 보고와 잘 일치하며, 막지질 과산화가 마이크로솜의 기능에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

결론적으로 시험관내 실험에서 간 균질액의 산소처리에 의한 retinyl palmitate 농도의 감소는 MFO 시스템의 cytochrome P450 양과 NADPH-cytochrome P450 reductase의 활성감소를 수반하였다. 또한 cytochrome P450-의존 aminopyrine N-demethylase와 benzpyrene hydroxylase의 활성 역시 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나 retinyl palmitate 농도 감소에 따른 마이크로솜 기능의 쇠퇴가 직접 retinyl palmitate 농도 자체에 기인하는 것인지에 대하여는 확인된 보고가 없으며, 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Ando, M., Katagiri, K., Yamamoto, S., Wakamatsu, K., Kawahara, I., Asanuma, S., Usuda, M. and Sasaki, K. Age-related effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal monooxygenase in rat liver. Environ. Health Perspect. 1997, **105**, 726-733.
2. Ashok, B. T. and Ali, R. The aging paradox: free radical theory of aging. Exp. Gerontol. 1999, **34**, 293-303.
3. Burcham, P. C. and Kuhan, Y. T. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, **220**, 996-1001.
4. Filsler, N., Margue, C. and Richter, C. Quantification of wild-type mitochondrial DNA and its 4.8-kb deletion in rat organs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, **233**, 102-107.
5. Gut, J., Kawato, S., Cherry, R. J., Winterhalter, K. H. and Richter, C. Lipid peroxidation decreases the rotational mobility of cytochrome P-450 in rat liver microsomes. Biochim. Biophys. Acta. 1985, **817**, 217-228.
6. Halliwell, B. and Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am. J. Clin. Nutr. 1993, **57**, 715S-724S; discussion 724S-725S.
7. Handler, J. A. and Brian, W. R. Effect of aging on mixed-function oxidation and conjugation by isolated perfused rat livers. Biochem Pharmacol. 1997, **54**, 159-164.
8. Hayashi, T. and Miyazawa, T. Age-associated oxidative damage in microsomal and plasma membrane lipids of rat hepatocytes. Mech. Ageing Dev. 1998, **100**, 231-242.
9. Karuzina, II and Archakov, A. I. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions. Free Radic. Biol. Med. 1994, **17**, 557-567.
10. Keller, J. N., Kindy, M. S., Holtsberg, F. W., St Clair, D. K., Yen, H. C., Germeyer, A., Steiner, S. M., Bruce-Keller, A. J., Hutchins, J. B. and Mattson, M. P. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. J. Neurosci. 1998, **18**, 687-697.
11. Lenaz, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. Biochim. Biophys. Acta. 1998, **1366**, 53-67.
12. Longmire, A. W., Swift, L. L., Roberts, L. J., Awad, J. A., Burk, R. F. and Morrow, J. D. Effect of oxygen tension on the generation of F2-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. Biochem. Pharmacol. 1994, **47**, 1173-1177.
13. Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat. Res. 1999, **424**, 83-95.

14. **Nash, T.** The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 1953, **55**, 416-421.
15. **Omura, T. and Sato, R.** The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* 1964, **239**, 2370-2378.
16. **Pierrefiche, G. and Laborit, H.** Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp. Gerontol.* 1995, **30**, 213-227.
17. **Plewka, A., Kaminski, M. and Plewka, D.** Ontogenesis of hepatocyte respiration processes in relation to rat liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system. *Mech. Ageing Dev.* 1998, **105**, 197-207.
18. **Szweda, L. I.** Age-related increase in liver retinyl palmitate. Relationship to lipofuscin. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 8712-8715.
19. **Watanabe, M., Tanaka, M., Tateishi, T., Nakura, H., Kumai, T. and Kobayashi, S.** Effects of the estrous cycle and the gender differences on hepatic drug-metabolising enzyme activities. *Pharmacol. Res.* 1997, **35**, 477-480.
20. **Wills, E. D.** Lipid peroxide formation in microsomes. Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. *Biochem. J.* 1969, **113**, 333-341.