

당뇨병 쥐 안조직에서 약물대사 효소와 Arachidonic Acid 대사과정에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 생화학교실
홍 영 숙

Abstract

Drug Metabolizing Enzymes and Arachidonic Acid Metabolism in Diabetic Rat Ocular Tissues

Young Sook Hong

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

The metabolism of drug and arachidonic acid(AA) by diabetic rat ocular tissues was studied. Little information is available on drug metabolism enzymes in ocular tissues. I investigated the presence of various cytochrome P-450 isoenzymes by measuring different drug metabolizing enzymes. i.e., 7-ethoxycoumarin-0-deethylase and benzphetamine demethylase activities in cornea and choroid, retina or sclera.

This results demonstrate that choroid, retina or sclera possess the highest activities of drug metabolizing enzymes. The highest activities of 7-ethoxycoumarin-0-deethylase and benzphetamine demethylase were found in choroid, retina or sclera. The highest activities of drug metabolizing enzymes is accompanied by high activity of NADPH cytochrome P-450(C) reductase, an integral component of this enzyme study. The choroid, retina or sclera possesses the high activity of metabolizing arachidonic acid to biologically active compounds, whereas the cornea has low activity of metabolizing arachidonic acid. A form of cytochrome P-450 has appear rat ocular tissues in diabetes and the effect of diabetes on ocular tissues cytochrome P-450 expression can be reversed by insulin treatment.

The specialized location of cytochrome P-450 isozymes in ocular tissues suggests a physiological function related to activation of endogenous compounds such as arachidonic acid, in addition to detoxification of drugs. Thus, the choroid, retina or sclera is the site of metabolism and detoxification of drugs are carried to ocular tissues via circulating blood.

서 론

Cytochrome P-450은 NADPH-dependent mixed-function oxidase system에서 terminal acceptor로

작용하며 독특한 집단으로 구성된 hemoprotein이다. 이런 system은 스테로이드, 지방산, 프로스타글란딘 그리고 leukotriene과 같은 내인성 기질과 polycyclic aromatic hydrocarbons 그리고 다른 환

경적 오염물질과 같은 외인성 기질들의 산화적 전환을 촉매한다¹⁻²⁾. Mixed-function oxidase system은 세가지 성분으로 구성되어 있다. Hemoprotein으로써 cytochrome P-450, NADPH cytochrome P-450(c) reductase로 확인된 flavoprotein reductase 그리고 phosphatidylcholine등이며 이들은 마이크로솜 system에서 전자 전달을 용이하게 해준다³⁾. Cytochrome P-450은 기질특이성, 위치특이성, 그리고 입체 이성체 들의 차이는 multiple form으로 존재한다⁴⁾.

그런고로 많은 반응중에서 한 산화반응만 탁월한 것은 주어진 조직과 세포형에 isozyme성분에 의하여 조절되어진다. 외부물질에 의하여 유도된 cytochrome P-450의 성질은 광범위하게 연구되었지만 질병에 의한 cytochrome P-450 유도는 잘 알려지지 않았다. 당뇨병은 흰쥐 간 마이크로솜의 aniline hydroxylation과 N-nitrosodimethylamine demethylation 활성이 증가된다⁵⁾. 당뇨병으로 유도된 주된 cytochrome P-450은 일치하는 것이다^{6,7)}.

약물대사의 주된 부위는 간장이지만, 간장의 조직에서 cytochrome P-450은 폐, 신장, 장, 심장 그리고 골수에서 설명되어 왔다⁸⁻¹⁰⁾. 그 밖에 안조직에서도 cytochrome P-450 존재와 monooxygenase인 aryl hydrocarbon hydroxylase의 활성이 안조직에서 높다는 것이 보고되었다¹²⁾. 그러므로 안조직에서 약물대사 과정과 화학약품의 해독작용이 일어나는 부위는 순환 혈액을 통해서 운반되는 곳이다¹³⁾.

최근 cytochrome P-450은 해독작용 뿐만아니라 arachidonic acid(AA) 대사물질과 같은 생물학적으로 활성화된 화학물질을 생성되게하는 매개물로서 알려져 왔다. Arachidonic acid는 간장과 신장에서 다양하게 산화된 대사 산물로 NADPH-cytochrome P-450 dependent 메카니즘에 의하여 대사된다^{14,15)}.

Corneal epithelial cytochrome P-450 dependent monooxygenase는 2개의 생물학적으로 활성화된 대사산물들로 AA가 전환되는 것이다. 하나는 신장 $\text{Na}^+ - \text{k}^+ - \text{ATPase}$ 의 자극제이고 다른 하나는 혈관수축 작용을 한다^{14,16)}. 이와같이 P-450 dependent monooxygenase는 약물해독작용은 물론 세포내에서 기능은 중재자의 역할을 하는 것이다.

본 연구는 당뇨병 흰쥐 안조직에서 약물대사 효소의 호라성으로 7-ethoxycoumarine-deethylase와

benzphthamin-N-demethylase을 측정하였고 이 반응에 작용하는 cytochrome P-450 isozyme의 존재를 확인하고 그리고 cytochrome P-450-dependent pathway를 통해서 AA가 당뇨병과 인슐린을 투여한 흰쥐 안조직에서 대사되는 정도를 관찰하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

Bovine serum albumin, glucose-6-phosphate, NADPH, NADP, 7-ethoxycoumarine, aminopyrine, cytochrome C, streptozotocin 및 arachidonic acid는 Sigma 회사에서 구입하였고 [1-¹⁴C]-arachidonic acid(56.5 μ Ci/mmol)은 Amersham에서 구입하였다. BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluidine salt)와 NBT(P-nitro blue tetrazolium chloride)는 Bio-Rad 회사의 Western blot Kit로 구입하였다. Monoclonal antibody(MAb) EtOH 1-98-1은 NIH, Molecular carcinogenesis 실험실에서 제조한 것을 공급 받아 사용하였다. 모든 다른 시약은 시약등급을 구입 사용하였다.

2. 실험동물

실험동물은 체중 200~250g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)로 정상군과 실험군으로 구분하여 사육하였다.

1) 정상흰쥐

정상흰쥐에 규정 사료 및 물을 자유롭게 공급하였고 생리 식염수를 0.1ml/100g체중씩 1일 1회 2일간 복강내로 투여하였다.

2) 실험군 흰쥐

Streptozotocin(Sigma chemical Co.) 50mg/kg in 0.1M sodium citrate, pH 4.5를 복강내로 1일 1회 2일간 투여하였다. 실험동물의 당뇨병 유발을 확인하기 위하여 흰쥐 뇨를 당노 시험지로 확인하였다. 인슐린 투여는 protamine zinc insulin 0.25 units/100g체중씩을 1일 1회 근육 주사하였다.

3. 실험방법

안조직의 제조 : Streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 쥐의 안구를 적출해서 각부위를 분리하였다. 안조직은 0.25M sucrose를 포함하는 0.1M-Tris-HCl,

pH7.6를 2배되게 넣고 균질화 시켰다. 이 균질 용액은 1500xg에서 10분동안 원심분리하고 상등액은 10,000xg에서 20분동안 원심분리하였다. 100,000 xg에서 상등액은 60분 동안 원심 분리해서 침전을 얻는다. 이 침전은 phosphate buffered saline(PBS), pH7.4로 다시 suspension시켰다.

마이크로솜 단백질 농도는 Lowry et al¹⁷⁾방법으로 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 측정하였다.

NADPH-cytochrome C reductase 활성 측정 방법 : NADPH-cytochrome C reductase의 활성은 Omura와 Takesue¹⁸⁾의 방법을 사용하여 550nm에서 흡광도 증가를 측정 계산하였으며, 이때 molar extinction coefficient는 $21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

7-Ethoxycoumarin-O-deethylase활성측정방법 : 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase의 활성도는 Aitio¹⁹⁾의 fluorometry방법으로 excitation은 368nm, emission은 456nm에서 측정하였다.

Benzphtamin-N-demethylase의 활성 측정법 : Benzphtamin-N-demethylase의 활성도는 Ferrero등²⁰⁾의 방법을 사용하여 412nm에서 흡광도 증가를 측정 계산하였으며, 이때 molar extinction coefficient는 $8 \times 10^5\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

Arachidonic acid 대사 : 마이크로솜 suspension(1-3mg protein)은 ¹⁴C-AA(0.4μCi, indomethacin, 10 μM) 그리고 NADPH-generating system(glucose-6-phosphate, 0.1mM, NADP 0.4mM, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1 unit) 전 부피를 1ml로 하고 30분간 37°C에서 노출시켰다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : 시료는 반응 혼합물인 5%-mercaptoethanol, 62.5M Tris-HCl(pH 6.8)과 함께 100°C에서 2분간 끓여서 용해시켰다. 단백질은 Laemi²¹⁾법으로 정량하였고 7.5% acrylamide separating gel은 0.75mm 두께로 하였다. SDS-gel의 단백질을 Coomassie Blue로 염색하였다.

Western blot : 마이크로솜에 있는 specific cytochrome P-450 isoenzyme의 규명은 1992년 National Institute of Health(NIH)에서 제조한 monoclonal antibody(EtOH. 1-98-1)을 사용하여 western blot 방법으로 시행하였다²²⁾. 단백질 시료는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 분리시키고

분리된 단백질을 nitrocellulose sheet에 옮겼다. 이때 buffer로는 25mM Tris, 192mM glycine 및 20% (V/V) methanol을 사용하였다.

Nitrocellulose는 PBS속에 3% gelatin과 같이 2시간 동안 실온에서 incubation하고 MAb용액은 PBS로 1 : 200으로 희석하여 4°C에서 하루밤동안 노출시켰다. 5% goat serum/PBS 용액으로 anti-mouse IgG와 alkaline phosphatase를 1 : 1000으로 희석한 용액을 2시간 동안 실온에 노출시킴으로써 conjugate시켰다. 그 다음 0.05% Tween 20/PBS로 씻은 후 BCIP/NBT phosphate 기질계를 사용하여 발색시켰다.

결 과

Cytochrome P-450 dependent mixed-function oxidase의 활성인 benzphtamin demethylase와 7-ethoxycoumarin-O-deethylase를 대조군과 당뇨병군 및 인슐린 투여군의 cornea 그리고 맥락막, 망막 및 공막에서 측정하여 표 1에 나타내었다.

Cytochrome P-450 dependednt 약물대사 효소와 통합된 성분인 NADPH cytochrome P-450(C) reductase활성을 비교하였다.

맥락막, 망막 및 공막에서 약물대사 효소인 benzphtamin demethylase와 7-ethoxycoumarin-O-deethylase의 활성이 높았다. 그러나 cornea에서는 검출되지 않거나 매우 낮은 값을 나타내었다. 그리고 NADPH cytochrome P-450(C) reductase의 활성은 cytochrome P-450 dependent monooxygenase의 활성과 일치하였다.

NADPH cytochrome P-450(C)의 활성이 높은 곳은 맥락막, 망막 및 공막이 합친 부위에서였다(표 1). 당뇨병 흰쥐 안조직에서 AA 대사산물 형성을 확인하고자, cytochrome P-450 dependent AA 대사산물형성을 측정하여 당뇨병 흰쥐 안조직 맥락막, 망막 및 공막의 부위에서 높은 활성을 얻을 수 있었다. 그리고 인슐린 투여군에서 AA 대사산물이 정상군과 같이 회복되는 것을 관찰하였다. 그림 1과 2에서 peak 1은 peak 2와 3은 AA 대사산물들이다. 그림 2-B에서와 같이 당뇨병군에서 AA 대사산물의 peak 3이 정상군보다 증가되어 있었고 인슐린 2주 투여군(그림 2-D)에서는 AA 대사산물의 형성중

peak 3이 약간 감소하였고, 인슐린 3주 투여군(그림 2-C)에서는 peak 3이 현저히 감소되었다.

Ethanol로 유도하여 정제한 cytochrome P-450의 monoclonal antibody인 ETOH 1-98-1을 가지고 western blot 방법을 사용하여 확인하였다. 그림 3은 정상, 당뇨병 및 당뇨병에 인슐린을 투여한 흰쥐

안조직중 맥락막, 망막 및 공막에서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리하여 coomassie blue로 염색한 것이다. 45Kd에서 나타난 cytochrome P-450 band를 보면 당뇨병쥐에서 가장 농도가 높았고 그 다음은 인슐린 투여 2주와 3주 순으로 낮아지는 것을 확인할 수 있다. Molecular

Table 1. Distribution of Benzphetamine-N-demethylase, 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase and NADPH Cytochrome P-450(C) Reductase in Normal and Diabetic Rat Ocular Tissues

Source	Benzphetamine N-demethylase	7-Ethoxycoumarin O-deethylase	NADPH-cytochrome(C) reductase
	Pmoles/mg protein/min		
Control cornea	N.D	1.63±0.134	0.44±0.042
Diabetes cornea	N.D	2.15±0.182	0.62±0.058
Diabetes cornea + Insulin	N.D	1.84±0.175	0.49±0.046
Control(choroid+ retina+sclera)	8.98±1.12	6.88±0.78	5.96±0.98
Diabetes(choroid+ retina+sclera)	10.43±2.02	8.40±0.94	7.32±1.03
Diabetes(choroid+ Insulin)	9.43±3.44	7.14±0.80	5.88±0.65
	9.43±3.44	7.14±0.80	5.88±0.65

The mean±SD

N.D.=not detectable

Fig. 1. Autoradiography of TLC separation of arachidonic acid metabolites formed by rat ocular tissues.
 A : Choroid, retina and sclera microsomes of control rat.
 B : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat.
 C : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 3 weeks.
 D : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 2 weeks.

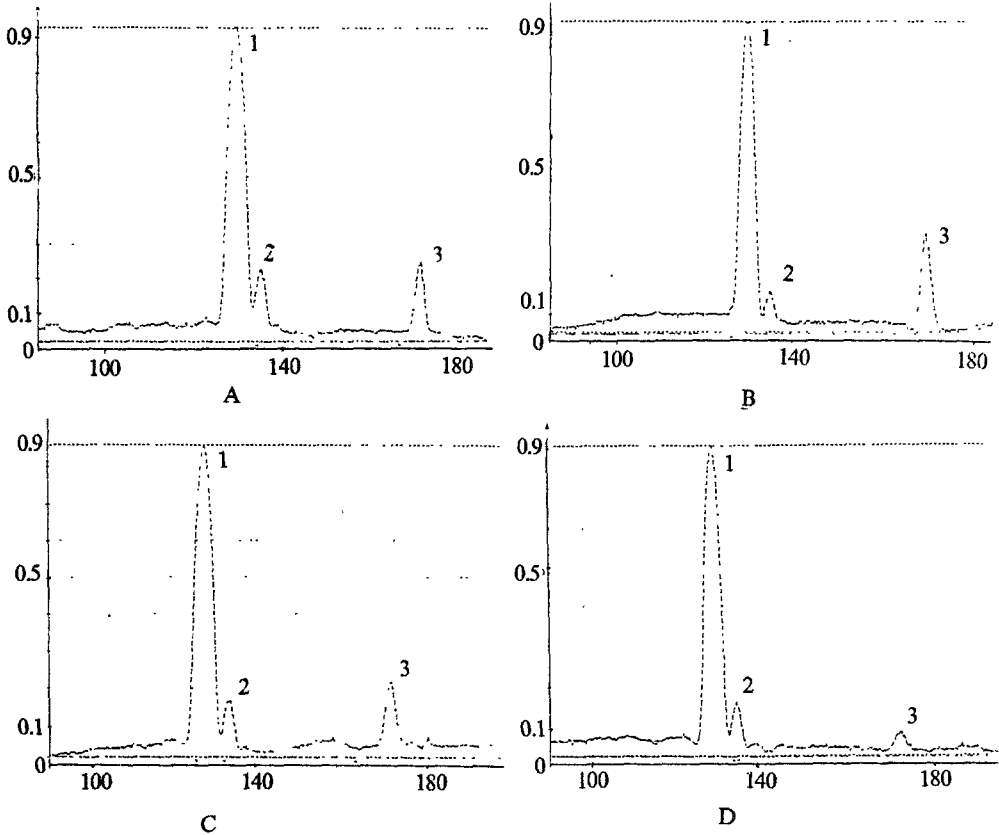


Fig. 2. Densitogram of TLC separation of arachidonic acid metabolites formed by rat ocular tissues.
 A : Choroid, retina and sclera microsomes of control rat.
 B : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat.
 C : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 3 weeks.
 D : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 2 weeks.
 Peak 1 represents AA, peak 2 and 3 represent the archidonate metabolites.

marker는 48Kd이다.

그림 4는 MAb EtOH 1-98-1를 SDS-PAGE에다 western blot한 결과 EtOH 1-98-1과 specific하게 band하나를 보여주고 있으며 그 강도를 보면 정상군과 당뇨병에 인슐린 3주 투여군은 같았고 당뇨병과 당뇨병에 인슐린 2주 투여군에서 같은 정도를 나타냈다.

이와같은 결과로 당뇨병쥐의 안조직 중 맥락막, 망막 및 공막에서 cytochrome P-450의 특정형 isozyme은 ethanol 특정형인 EtOH 1-98-1와 같은 것임을 확인하였다.

고 찰

약물과 환경 오염 물질이 체내에 들어오면 간 약물대사 작용에 관여하는 효소계에 의하여 대사되어진다. 이런 대사 작용은 간 조직이외의 조직에서도 일어나며 안조직에서도 약물대사 작용이 일어난다고 보고된 바 있다²¹⁻²²). 순환혈액에서 약물이 운반되거나 그자체내에 화학물질들을 안조직은 축적하는 경향이 있다. 이와같은 약물과 화학물질들에 의한 해독작용의 기전이 명백히 밝혀 지지 않고 있으며 이런 화학물질은 시력 손상에 원인이

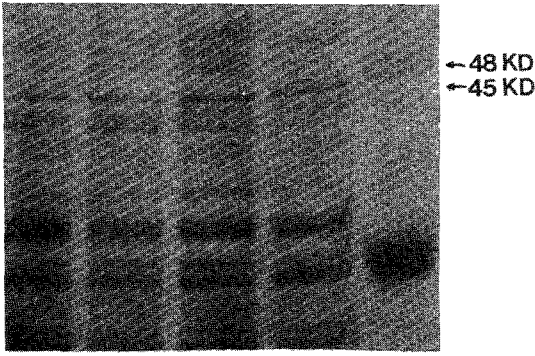


Fig. 3. Analysis of diabetic rat ocular tissues proteins by SDS-polyacrylamidegel electrophoresis and coomassie blue staining.
 A : Choroid, retine and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 3 weeks.
 B : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 2 weeks.
 C : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat.
 D : Choroid, retina and sclerra microsomes of control rat.
 < : Molecular marker.

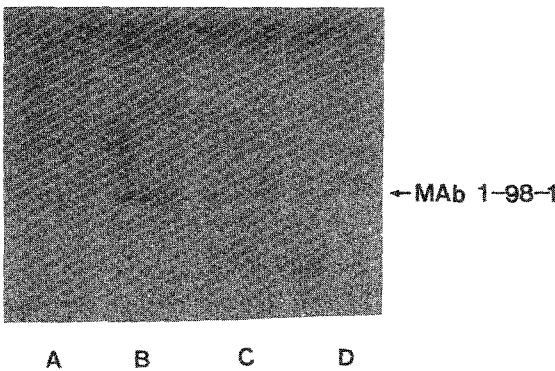


Fig. 4. Western blot analysis using ethanol induced MAb 1-90-1.
 A : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 3 weeks.
 B : Choroid, retina and sclera microsomes of diabetic rat treated with insulin for 2 weeks.
 C : Choroid, retina and sclerra microsomes of diabetic rat.
 D : Choroid, retina and sclerra microsomes of control rat.

될 수도 있다.

본 연구는 스트렙토조토신으로 당뇨병을 유발시킨 흰쥐 안조직에서 약물과 화학물질들을 해독시키는 기전을 알아보기 위하여, cytochrome P-450 dependent monooxygenase와 NADPH cytochrome P-450(C) reductase의 분포를 측정하였다.

NADPH cytochrome C reductase의 활성은 맥락막 및 망막에서 가장 높은 분포를 나타냈으며 이는 소 안조직에서와 같은 결과를 보여주었다²³⁾. NADPH cytochrome P-450(C) reductase는 마이크로솜 monooxygenase의 구성요소의 한 성분이다. 이 reductase는 한가지 형태만 있으므로 어떤형의 cytochrome P-450 다발성 특정형 반응이 일어나는 곳마다 같이 존재하게 된다²⁴⁾. 그러므로 안조직에서 NADPH cytochrome C reductase가 검출되는 것은 cytochrome P-450이 존재한다는 것을 제시하는 것이다²⁵⁾.

약물대사 효소인 7-ethoxycoumarin-O-deethylase와 benzphetamine-N-demethylase 효소의 활성은 맥락막, 망막 및 공막에서 높은 값을 나타냈다. 이는 안조직의 맥락막, 망막에서 약물대사 효소의 활성이 높다는 것이 입증되었다. 이 부위는 맥락막 모세혈관에서 부터 직접적으로 영양 물질을 받는 곳이다.

Cytochrome P-450계는 해독작용 뿐만 아니라 AA 대사 산물과 같은 생물학적으로 활성화된 화합물을 생성하기도 한다. 즉 AA 대사 산물인 프로스타글란딘 중간산물들은 안조직에 자극과 외상에 대하여 반응한다는 것이 알려져 왔다.

당뇨병군의 안조직에서 특정형의 cytochrome P-450 isoenzyme을 확인하기 위하여 ethanol로 유도하여 정제된 cytochrome P-450의 MAb 즉 ethanol 1-98-1을 갖고 western blot를 하여 당뇨병의 안조직의 특정형 isoenzyme은 투여시 같은 형태임을 확인하였다(그림 3, 4).

ω 또는 (ω -1)-hydroxy arachidonic acid는 강력한 생물학적 활성을 갖는다. ω -hydroxy arachidonic acid는 혈관 수축제이며(ω -1)-hydroxy arachidonic acid는 Na^+/K^+ -ATPase의 자극제이다. 지방산의 ω 과 (ω -1)hydroxylation은 β -oxidation 비교해서는 minor pathway다. 그러나 기아 또는 당뇨병에서 β -

와 (ω -1)hydroxylation이 자극된다.

당뇨병 유발시킨 흰쥐와 인슐린을 투여한 흰쥐 안조직에서 AA의 대사 과정의 분포를 측정하여, 맥락막, 망막 및 공막에서 AA대사산물의 농도는 매우 낮게 나타났으며 인슐린 투여로 정상군과 같은 양상이었다.

안조직의 맥락막, 망막 및 공막 부위에서 monooxygenase의 활성이 높고 AA대사가 높은 것으로 보아 이 부위가 안조직중에서 가장 혈액 공급이 잘 되므로 약물 및 화학물질의 해독작용에 중요한 역할을 할 것이라고 생각된다.

References

- 1) Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM : *Principles of Biochemistry*. Worth 2nd Ed. Seoul 1993 : 655-657
- 2) Porter TD and Coon MJ : *Cytochrome P-450 J Biol Chem*. 1991 : 226 : 13469-13472
- 3) Lu, AYH Junk KW and Coon MJ : *Resolution of the cytochrome P-450 containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components. J Biol Chem*. 1969 : 244 : 3714-3721
- 4) Lu, AYH and West, SB : *Multiplicity of mammalian microsomal cytochrome P-450, Pharmacol Rev* 1980 : 31 : 277-295
- 5) Peng R, Tennat P, Lorr NA and Yang CS : *Carcinogenesis* 1983 : 4 : 703-908
- 6) Pyan DE, Ramanathan L, Iida S, Thomas PE, Haniu M, Shively JE, Lieber CS and Levin WJ *Biol Chem* 1985 : 260 : 6385-6393 :
- 7) Potten CJ, Ning SM Lu AYH and Yang CS : *Arch Biochem biophys* 1986 : 251 : 629-638
- 8) Schwartzman ML, Abraham NG, Carroll MA, Levere RD and Mcgiff JC : *Regulation of arachidonic acid metabolism by cytochrome, P-450 in rabbit kidney. Biochem J* 1986 : 238 : 283-290
- 9) Dees JH, Masters BSS, Muller-Eberhard U and Johnson EF : *Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-O-dioxin and phenobarbital on the occurrence and distribution of four cytochrome P-450 isozymes in rabbit kidney, lung and liver. cancer Res* 1982 : 42 : 1423-1432
- 10) Abrahan NG, Feldman E, Falck JR, Lutton JD and Schwartzman ML : *Modulation of erythropoiesis by novel human bone marrow cytochrome P-450 dependent metabolites of arachidonic acid Blood* 1991 : 78 : 1461-1466
- 11) Kishida KI, Matsumoto K, Manabe R and Sugicyama T : *Cytochrome P-450 and related components of the microsomal electron transport system in the bovine ciliary body. Curr Eye Res* 1986 : 5 : 529-533
- 12) Das NO and Shichi H : *Enzymes of mercapturate synthesis and other drug-metabolizing reactions-specific localization in the eye Exp Eye Res* 1981 : 33 : 525-533
- 13) Shichi H and Nebert DW : *Drug metabolism in ocular tissues. In "Extrahepatic metabolism of drugs and other foreign compounds" (Ed. Gram T.E.) MTP Press Limited, Lancaster* 1980 : 333-363
- 14) Douglas JC, Romero M and Hopfer U : *Signaling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium Kidney Int* 1990 : 38 : s43-s47
- 15) Escalante B, Erlj D, Falck JR and Mcgiff JC : *Effect of cytochrome P-450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit. Kidney loop of Henle. Science* 1991 : 251 : 799-802
- 16) Masferrer J, Schwartzman MH, Abraham NG, Dunn MW and Mcgiff JC : *Cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in bovine corneal epithelium Invest Ophthalmol vis sci(suppl)* 1986 : 27 : 50
- 17) Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL and Randell RJ : *Protein measurement with the folin phenol reagent J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
- 18) Omura T and Takesue S : *A new method for simultaneous purification of cytochrome b5 and NADPH-cytochrome C reductase from rat liver microsomes. J Biochem* 1970 ; 67 : 249-257
- 19) Aitio A : *A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin-O-deethylation Anal Biochem* 1978 : 85 : 488-491
- 20) Feerrero RW, Orisi R and Bernelli-Zazzera : *Effect of ischemia on drug-metabolizing microsomal enzymes in rat liver. Exp. Mol Pathology* 1978 : 28 : 256-266
- 21) Laemmli UK : *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* 1970 : 227 : 682-685

- 22) Thomas PE, Bandiera S, Maines SL, Ryan DE and Levin W : *Regulation of cytochrome P-450 : A high-affinity N-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsomes. Biochemistry* 1987 : 268 : 2280-2289
- 23) Ellis PO, Little join, K and Deitrich RA : *Enzymatic hydrolysis of pilocarpine. Invest Ophthal* 1972 : 11 : 747-751
- 24) Galleros AT, Partida PD and Garzon R : *The presence of 6 β -steroid hydroxylase in human cornea. J Steroid Biochem* 1976 : 7 : 135-137
- 25) Schwartzman ML, Masferrer J, Dunn WM, Mxgift JC and Abraham MG : *Cytochrome P-450, drug metabolizing enzymes and arachidonic acid metabolism in bovine ocular tissues, Current eye res* 1987 : 6 : 623-630
- 26) Vermillion JT, Ballou DP, Massey V and Coon MJ : *Separate roles for FMN and FAD in Catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. J Biol Chem* 1981 : 256 : 266-277
- 27) Dees JH, Coe LD, Hasukochi Y and Masters BSS : *Immunofluorescence of NADPH-cytochrome C(P450) reductase in rat and mini-pig tissues injected with phenobarbital. Science* 1980 : 208 : 1473-1475
- 28) Tanaka S, Imooka S, Kusunose E, Kusunose M, Maekawa M and Funae Y : *ω -and(β -1) hydroxylation of arachidonic acid, lauric acid and prostaglandin A, by multiple forms of cytochrome P-450 purified from rat hepatic microsomes. Biochem Biophys Acta* 1990 : 1043 : 177-181