

Vitamin E 결핍증 흰쥐의 간조직내 Catalase, Cytochrome P-450 및 b₅의 변화

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍 영 숙·성 낙 응

=Abstract=

Effects of Different Vitamin E-deficient Basal Diets on Hepatic Catalase and Microsomal Cytochrome P-450 and b₅ in Rats

Young Sook Hong and Nak Eung Sung

Department of Biochemistry, Ehwa Womans University School of Medicine

Male Wistar rats maintained for a period of 6 weeks on a basal vitamin E-deficiency diet consisting of 70% sucrose, 20% vitamin-free casein, 4% tocopherol, stripped lard, 4% salt mixture, and 2% tocopherol-free vitamin fortification mixture were used to compare two sets of commonly used salt mixture (salt mixture USP XW versus Briggs' salt mixture).

Among the rats maintained on the deficient diets for 6 weeks, only that received the combination of Briggs' salt mixture showed a significantly lower level of hepatic catalase activity, cytochrome P-450, and b₅ compared to the corresponding control animals.

Since the most striking differences in these diets are in their content of iron, it appears that these two dietary constituents may intact in modulating the effect of vitamin E on hepatic hemoproteins.

서 론

Vitamin E의 생화학적인 역할은 수십년동안 연구되어 왔다. 전에 많은 연구들은 주로 지질의 peroxidation을 예방하는 효과들에 대한 연구들이었다. 최근에 와서, 많은 연구들은 vitamin E가 hepatic microsomal drug hydroxylating system에 효과를 나타내어 있다는 것이 알려졌다^{1,2)}. Carpenter¹⁾의 연구에 의하면 vitamin E가 결핍된 흰쥐 간조직에서 codeine이 norcodeine으로 되는 N-demethylation은 감소하였고 morphine으로 변하는 O-demethylation과정은 효과

가 없다고 보고하였다. 그외에도 Quaife와 Friedman은 vitamin E가 결핍된 흰쥐에서 codeine의 O-demethylation에는 효과가 없고 aminopyrine을 substrate로 사용하였을 때 N-demethylation에는 감소가 있다고 보고하였다.

또한 Murty³⁾등은 heme 합성에서 vitamin E의 가능한 역할을 두 개의 중요한 효소의 양을 측정함으로써 나타냈다. Active succinyl CoA와 glycine이 결합하여 α -amino- β -ketoacid 그리고 δ -aminolevulinic acid를 형성하는 데 관여하는 δ -aminolevulinic acid synthetase는 vitamin E가 결핍된 동물에서 활성도가 정상 범위에 들어가나 heme 합성에 중간산물인

porphobilinogen 형성에 관계하는 효소인 δ -aminolevulinic acid dehydratase는 의의 있게 감소하였다.

이런 결과로 보아 vitamin E가 heme biosynthesis에서의 역할은 hepatic hemoprotein의 감소와 관계가 있다는 것을 제시해 준 것이었다. 그후 Caasi⁴⁾등은 vitamin E가 결핍된 동물에서 cytochrome P-450과 tryptophan oxygenase와 같은 enzyme를 측정하여 의의있는 감소를 보고하였다.

저자들은 vitamin E가 결핍된 흰쥐에다 hepatic hemoprotein에 관계하는 mineral의 공급을 다르게 해서 그들의 효과를 보기 위하여 cytochrome P-450과 b_5 및 catalase를 측정하여 좋은 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

실험 방법

1. 실험동물 : 40~50g의 음성 흰쥐(Wistar)를 실험에 사용하였다. 각 실험군은 흰쥐를 6마리씩 하여 다음과 같은 食餌로 6週間 飼育하였다. Vitamin E 결핍 食餌는 서로 다른 2종류를 使用하였고 대조군과 실험군의 基本食餌는 70% sucrose, 20% vitamin-free casein, 4% tocopherol-free lard 그리고 2% NBC vitamin mixture(tocopherol-free)⁵⁾: Diet A, 4% USP salt mixture XW; Diet B, 4% Briggs' salt mixture(Table 1)⁵⁾ 대조군에는 300mg의 DL- α -tocopherol(75IU)를 주었다.

Table 1. Composition of diets

Ingredient	Percentage Composition			
	Diet A		Diet B	
	Control	Experimental	Control	Experimental
Sucrose	70	70	70	70
Vitamin-free Casein	20	20	20	20
Stripped lard	4	4	4	4
Saltmixture, USP XW	4	4	—	—
Salt mixture, Briggs' williams	—	—	4	4
Vitamin fortification mixture NBC	2	2	2	2
Iron Content	100	100	21	21
DL α -tocopherol	300	—	300	—

이 두 食餌의 差異는 USP XW salt mixture가 Briggs' salt mixture보다 iron이 5배(100mg/kg diet 대 21mg/kg of diet)만큼 더 많이 들어있는 것이다.

2. 測定方法 : 동물은 실험전에 24시간 굶었다. 그

리고 ether 마취 후 간조직을 절취하여 ice cold isotonic sucrose로 2회 씻고 0.25M sucrose로 25% homogenate를 만들었다. Nuclei, cell debris 및 mitochondria는 15,000×g에서 20분 동안 원심 분리함으로써 제거시켰다. 침전물은 버리고 상층액을 105,000×g에서 한시간 동안 원심 분리한 후 microsomal 침전물은 0.25M sucrose로 gm/ml되게 resuspension시켰다.

Cytochrome P-450은 Omura와 Sato⁶⁾ 方法에 의하였고 그리고 cytochrome b_5 는 Smuckler⁷⁾의 方法으로 測定하였다.

Hepatic catalase는 1g의 간조직을 M/150 phosphate buffer pH 7.0(10ml)에 homogenize하였고 2,000×g에서 10분 동안 원심 분리하고 상층액을 모았다. 이 상층액은 240nm에서 hydrogen peroxide가 소멸되는 정도로 catalase activity를 測定하였다⁸⁾. 단백질은 Lowry 方法⁹⁾에 의하였고 血清 vitamin E 測定은 15 ml의 glass-stoppered 원심침전 시험관에 1.0ml의 血清에다 1.0ml 재증류 95%-ethanol을 잘 혼합한 후 3ml의 petroleum ether(B.P. 40~60°C) 加하고 3분 동안 잘 흔든다¹⁰⁾. 그리고 원심 분리한 다음 2ml의 petroleum ether층을 취하고 50°C의 水浴에서 窒素 gas下에 증발시킨다. 다음 0.1ml의 chloroform을 加하여 liquid residue를 溶解시키고 1.0ml의 ethanol, 0.1ml의 0.2% bipyridyl 및 0.1ml 0.1% ferric chloride를 加하고 30초 동안 잘 혼합하여 520nm에서 spectrophotometer로 吸光度를 읽었다.

실험 성적

1) **Cytochromes P-450** : Vitamin E 결핍된 사료로 사육한 흰쥐에서 hepatic microsome의 cytochrome P-450의 양은 Table 2와 같이 Diet A에서 對照群이 1.168 ± 0.139 nmol/g liver, 0.264 \pm 0.013nmol/mg protein, 實驗群이 0.863 ± 0.091 nmol/g liver, 0.188 \pm 0.019nmol/mg protein으로 意義있게 감소됨을 나

Table 2. Hepatic microsomal content of P-450 in rats maintained on the experimental and control diets

Diets	Nmoles/g liver		Nmoles/mg protein	
	Experimental	Control	Experimental	Control
A	0.853 ± 0.091	1.148 ± 0.139	0.188 ± 0.019	0.264 ± 0.013
	P < 0.01		P < 0.05	
B	0.530 ± 0.141	0.896 ± 0.139	0.136 ± 0.032	0.200 ± 0.018

The result are expressed as means \pm SEM.

타내었다. Diet B에서도 대조군은 0.896 ± 0.139 nmoles/g liver, 0.200 ± 0.018 nmoles/mg protein, 실험군이 0.530 ± 0.141 nmoles/g liver, 0.136 ± 0.032 nmoles/mg protein로써 실험군이 감소를 나타냈다. 그리고 Fe의 농도가 다른 두 사료로 키워진 군을 비교해 보면 iron content가 많은 食餌에서 cytochrome P-450의 양이 증가함을 볼 수 있었다.

2) **Cytochrome b₅**: Vitamin E가 결핍된 흰쥐에서 microsomal cytochrome b₅는 table 3과 같이 vitamin E 결핍군에서 有意性있게 감소됨을 볼 수 있었고 cytochrome P-450과는 다르게 食餌속에 iron content와는 별 상관없이 없는 결과를 나타냈다.

Table 3. Hepatic microsomal content of cytochrome b₅ in rats maintained on the experimental and control diets

Diets	Nmoles/g liver		Nmoles/mg Protein	
	Experimental	Control	Experimental	Control
A	0.370 ± 0.070	0.636 ± 0.171	0.090 ± 0.02	0.137 ± 0.030
	P<0.05		P<0.01	
B	0.397 ± 0.025	0.580 ± 0.005	0.083 ± 0.012	0.143 ± 0.006

The results are expressed as means \pm SEM

3) **Hepatic catalase**: 어린 동물에서 vitamin E의 결핍은 hepatic catalase 활성화에 기능적 손상을 가져오는 역할을 한다. vitamin E를 결핍시킨 흰쥐에서 catalase의 활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Hepatic catalase activity in rats maintained on the experimental and control diets

Diets	Nmoles/g liver		Nmoles/mg protein	
	Experimental	Control	Experimental	Control
A	3.97 ± 0.083	4.53 ± 0.208	15.96 ± 0.473	18.83 ± 1.041
	P<0.01		P<0.01	
B	3.20 ± 0.200	4.00 ± 0.200	12.16 ± 0.473	14.10 ± 0.625

The results are expressed as means \pm SEM

vitamin E 결핍군에서 有意性있게 hepatic catalase activity가 감소되었다. Iron content가 다른 群에서 보면 iron이 많은 群에서 catalase의 활성이 有意性있게 높은 것(P<0.01)을 나타내었다.

4) **Serum vitamin E**: 對照群과 實驗群의 serum vitamin E의 량은 Table 5와 같다. Serum vitamin E의 level은 對照群보다 實驗群이 감소되는 경향이었고

Table 5. Serum vitamin E levels in rats maintained on the experimental and control diets

Diets	Control mg/100ml	Experimental mg/100ml
A	0.625 ± 0.054	0.434 ± 0.048
B	0.557 ± 5.182	0.305 ± 0.134

iron content에 따른 것도 iron이 적은 群에서 낮은 것을 나타냈다.

고 찰

Vitamin E 결핍 흰쥐에서 Fe가 적게 들은 實驗食餌로 飼育한 흰쥐에서 제조한 microsome에서 有意性있게 cytochrome P-450이 감소되었다. (0.136 ± 0.032 nmoles/mg protein 0.530 ± 0.141 nmoles/g liver, P<0.01) 같은 조건에서 cytochrome b₅도 (0.083 ± 0.012 nmole/mg protein, 0.397 ± 0.025 nmoles/g liver)로 다소 감소되었다. 이런 결과는 vitamin E 결핍과 Fe content는 hemoprotein과 밀접한 관계가 있다는 것을 시사해 준다. 최근 연구들은 dietary constituent가 microsomal 약물대사와 heme-dependent 기능면에 영향을 미친다고 한다. Becking¹¹⁾은 iron이 결핍된 흰쥐에서 microsomal cytochrome P-450과 b₅의 농도가 변화됨이 없이 aminopyrine, pentobarbital 그리고 aniline의 P-450-dependent metabolism이 증가되는 원인이라는 것은 관찰하였다. 이와 비슷하게 hexobarbital의 side chain oxidation과 aminopyrine의 demethylation 및 cytochrome b₅의 microsomal content가 iron 결핍에서 보고되어 왔다¹²⁾. 그러나 vitamin E 결핍에서 Fe의 필요량이 알려져 있지 않기 때문에 vitamin E-deficient rat에서 limiting factor가 될 수 있는 heme 합성에 필요한 최소한의 량을 연구하는 것이 남아 있는 과제이다.

Johnson¹³⁾등은 mice에서 적혈구 catalase에 대한 amino-triazole의 효과를 보고 vitamin E 결핍 생쥐는 hydrogen peroxide가 축적된다는 결론을 얻었다. 그래서 vitamin E 결핍 적혈구에다 catalase를 가해 주었을 때 hemolysis의 속도가 감소되는 것을 보고 하였다¹⁴⁾¹⁵⁾. 그런코로 peroxide의 농도가 증가하는 것은 vitamin E 결핍이 heme enzyme catalase의 활성을 감소시키는 것을 나타내 주는 것이다.

McCoy¹⁶⁾등에 의하면, 흰쥐에서 tocopherol의 필요량은 1mg/day, iron은 hemoglobin의 합성을 위해서 0.25mg/day 그리고 수유와 생산을 위해서는 5mg/day

이다. 여기서는 대조군에서 흰쥐가 음식을 15g/day 소모했을 때 dl- α -tocopherol 1.1mg을 주었다. 똑같은 기준으로 Briggs' salt mixture는 0.35mg의 iron을 공급했고 USP salt mixture XIV은 1.5mg의 iron을 주었다.

대조군에서 간조직 g당 hepatic catalase는 iron을 적게 준 群이 iron을 많이 준 群보다 높은치를 보였다. 이런 결과에서, hepatic catalase 활성에 대한 vitamin E 결핍 효과는 많은 량의 iron을 음식에서 섭취해야 한다는 것이 명백해 진다.

Baustad와 Nafstad¹⁷⁾는 piglet(돼지새끼)에서 vitamin E 결핍은 anemia가 형성되는 것을 보고 piglet에서 정상 hematopoiesis를 유지하는 데 vitamin E가 필요하다라는 것을 지적했다. 사람에서도 iron-결핍으로 인한 빈혈은 대조군보다 血清 vitamin E의 농도가 낮았다¹⁸⁾. 이때 빈혈 환자에다 6~8주간 iron을 주면 血清 vitamin E의 량이 증가함을 볼 수 있었다. 이런 모든 비교에 비추어 볼 때 vitamin E와 heme은 밀접한 관계가 있다는 것을 제시해 주는 것이다.

—References—

- 1) Carpenter, M.P.: Vitamin E and microsomal drug hydroxylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 231 : 52, 1971.
- 2) Carpenter, M.P. and C.N. Howard, Jr.: Vitamin E, steroids and liver microsomal hydroxylation. *Am. J. Clin. Nutr.* 27 : 966, 1974.
- 3) Murty, H.S., P.I. Caasi, S.K. Brooks and P.P. Nair.: Biosynthesis of heme in the vitamin E deficient rat. *J. Biol. Chem.* 245 : 5498, 1970.
- 4) Caasi, P.I., J.W. Hauswirth and P.P. Nair.: Biosynthesis of heme in vitamin E deficiency. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 203 : 93, 1972.
- 5) Briggs, G.M. and M.A. Williams.: A new mineral mixture for experimental rat diets and evaluation of other mineral mixtures. *Federation Proc.* 22 : 601, 1965.
- 6) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239 : 237, 1964.
- 7) Smuckler, E.A., E. Arrhenius and T. Hultin: Alternations in microsomal electron transport, oxidative N-demethylation and azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine induced liver injury. *Biochem. J.* 103 : 55, 1967.
- 8) Luck, H.: Catalase, in *methods of enzymatic analysis*, edited by H.U. Bergmeyer, New York: Academic, 1963, p.885.
- 9) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
- 10) Bieri, J.G., L. Teets, B. Belavady and E.L. Andrews.: Serum vitamin E levels in a normal adult population in the washington D.C. area. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 117 : 131, 1964.
- 11) Becking, G.C.: Influence of dietary iron levels on hepatic drug metabolism in vivo and in vitro in Rat. *Biochem. Pharmacol.* 21 : 1585, 1972.
- 12) Catz, C.S., M.R. Juchau and S.J. Yaffe Effects of iron, riboflavin and iodide deficiencies on hepatic drug-metabolizing enzyme system. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 174 : 197, 1970.
- 13) Johnson, W.P., D. Jefferson and C.E. Mengel: In vivo hemolysis due to hyperoxia: role of H₂O₂ accumulation. *Aerospace Med.* 43 : 943, 1972.
- 14) Fee, J.A. and H.D. Teitelbaum: Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting redblood cells against peroxidative hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 : 150, 1972.
- 15) Rose, C.S. and P. Gyorgy: Specificity of hemolytic reaction in Vitamin E-deficient erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 168 : 414, 1952.
- 16) McCoy, R.H.: Dietary requirements of the rat. In: *The rat in Laboratory investigation*, edited by E.J. Farris and J. Q. Griffith, Jr. New York, Hafner, 1949, p68-103.
- 17) Baustad, B., and I. Nafstad: Haematological response to vitamin E in piglets. *Brit. J. Nutr.* 28 : 183, 1972.
- 18) Fujii, T.: Role of vitamin E in iron deficiency anemia. *Keio J. Med.* 17 : 207, 1968.