

## Higenamine이 흰쥐 간조직 Mixed Function Oxidase System에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실  
이화여자대학교 의과대학 약리학교실\*

홍영숙 · 배영숙\* · 성낙응

= ABSTRACT =

### Studies on the Hepatic Microsomal Mixed Function Oxidase System with Higenamine on the Rat

Young - Sook Hong, Ph. D., Young - Sook Pae\* M.D. and Nak - Eung Sung, M.D.

*Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University*

*\* Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University*

The effect of intraperitonally administered higenamine on the cytochrome P-450, b<sub>5</sub>, P-nitroanisole-O-demethylase and lipid peroxidation in the rat hepatic microsomes were determined.

The following results were obtained ;

1) The intraperitonally administered higenamine increased contents of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 and b<sub>5</sub>.

2) The principal role of cytochrome P-450 in mixed function oxidase reactions includes hydroxylation of various drugs, fatty acids, steroids, pesticides and carcinogens. The increased cytochrome P-450 induced by higenamine decreased on the both AAF of N-hydroxylation and Ring-hydroxylation.

3) Activity of P-nitroanisole-O-demethylase in hepatic microsomes with higenamine was decreased according to increased dosage of higenamine.

4) The formation of lipid peroxides was increased according to increased dosage of higenamine.

### 서 론

부자는 一名 鳥頭 (Aconiti Radix)라 하고 미나리아재비과 (毛茛科 : Ranunculaceae)에 속하는 다년생 草

本으로서 우리나라 각지에 야생하며 그 모근을 草烏頭 (Aconiti tuber)라 한다. 부자속 식물의 잎 줄기 및 뿌리에는 aconine 系 알칼로이드들이 함유되어 있으며 이들은 독성이 매우 강하여 모든 알칼로이드중 가장 독성이 크다고 하여도 과언이 아니다. 주성분을 이루고 있

는것으로는 aconitine, mesaconitine, jesaconitine, hepaconitine 등으로 독성이 매우 강한것들이며 이들은 비교적 쉽게 가수분해 또는 가열분해 됨으로써 독성이 약화 된다고 한다. 이들은 한방에서 강심, 이뇨, 흥분, 진통 및 체온의 저하로 오는 설사의 지사 목적으로 사용되어 왔다<sup>1)</sup>.

이와같은 부자에서 강심효과를 나타내는 성분으로 무색판상 결정을 얻었으며 그 구조는 dl-1-(4-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride(一名 dl-demethylcoclaurine · HCl) 라고 밝히고 이를 higenamine 이라고 명명 하였다<sup>2)</sup>.

권등<sup>3)</sup>은 higenamine 이 강심효과와 활동전압의 기간을 단축시키는 두가지 효과를 동시에 나타냄을 보고한바 있다. Park 등<sup>4)</sup>은 higenamine 의 강심작용은 adrenaline 수용체를 통해 나타난다고 하였으며 이는 higenamine 이 dopamine 구조를 가지고 있음을 암시하며 이와 관련성이 있음을 시사한바 있다.

저자는 Higenamine 의 강심효과 이외에 간조직에 대한 효과를 밝히고자 본 실험을 시도 하였다. 흰쥐 복강내로 higenamine 을 투여하여 간조직내 mixed function oxidase system 즉 cytochrome p-450 과 b<sub>5</sub> 및 p-nitroanisole-o-demethylase 활성을 측정하고 약물대사를 알고자 간암을 일으키는 물질인 2-acetylaminofluorene (AAF) 의 대사적 활성화 과정을 측정하였다. 그리고 lipid peroxidation 을 측정하여 microsomal membrane 에 영향을 관찰하고 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### A. 실험재료

실험동물로는 체중 200 g 내외의 숫컷 흰쥐(sprague-Dawley)를 전 실험을 통하여 사용하였다. 실험동물은 대조군 (0.9% NaCl 용액 투여군) 과 13 mg/kg, 50mg/kg 및 100 mg/kg 의 higenamine 을 복강내로 주사한군으로 나누었다.

실험약물로는 higenamine (서울대학교 생약연구소), [9-<sup>14</sup>C]-AAF (sp. activity 40 mci / mmol) (New England Nuclear Corp., USA), NADPH (Boehringer Mannheim Biochemicals In., USA), 그의 시약은 reagent grade 를 사용하였다.

### B. 실험방법

#### 1) Microsome 의 분리 :

흰쥐에서 절제한 간조직을 potter Elvehjem homog-

enizer 를 사용하여 0.25 M-ice cold isotonic sucrose 용액으로 25% homogenate 를 만들었다. 이를 냉동원침기 (Damon/ Model ice B-20 A) 로 9000 g에서 20 분간 원심분리하고 이의 상층액을 다시 9000g에서 10 분간 원심분리하여 침전되는 핵과 mitochondria 층을 제거하였다. 이 상층액을 다시 105,000g에서 1시간 동안 초원심분리기 (Beckman/ Model L8-80) 로 원심분리하여 침전된 microsome 을 분리 하였고 0.25 M sucrose 로 1 g/ml 되게 균질용액을 만들었다.

#### 2) AAF 의 Ring 과 N-Hydroxylation 측정방법:

AAF 의 Ring- 과 N-hydroxylation 을 위한 incubation medium 으로는 50 mM HEPES buffer PH 7.8, 100 mM KF, 0.1 mM [<sup>14</sup>C-9]-AAF 0.2 μci, 272 mM acetone 그리고 microsomal fraction 을 넣어 총량을 1.0 ml 로 하였으며 37 °C에서 30분간 incubation 하였다. Hydroxylated metabolite 는 ethyl ether 를 사용하여 추출하고 N-과 ring-hydroxy AAF 는 cyclohexane : t-butanol : acetic acid : H<sub>2</sub>O 가 18 : 2 : 2 : 1 인 용매를 사용하여 paper chromatography 로 분리하고 liquid scintillation counter 로 radioactivity 를 측정하여 정량하였다<sup>5)</sup>.

#### 3) Cytochrome p-450 과 b<sub>5</sub> 의 정량법 :

Microsomal cytochrome p-450 함량 측정은 Omura 와 Sato<sup>6)</sup> 의 방법으로 reduced carbon monoxide complex 를 450 nm 와 490 nm 에서 spectrophotometer (Perkin-Elmer 554) 로 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient 는 91 nm<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 로 하였다.

Cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 Smucker 등<sup>7)</sup> 의 방법으로 측정하였다.

#### 4) P-Nitroanisole-O-Demethylase 측정방법 :

p-Nitroanisole-o-demethylase 의 활성은 Netter 와 Seidel 방법으로 400 nm 에서 optical density 를 측정하였다. Molar extinction coefficient 14.5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 를 사용하여 계산하였다.

#### 5) Lipid peroxidation 측정방법 :

Lipid peroxidation 함량은 malondialdehyde 의 양을 thiobarbituric acid<sup>8)</sup> 방법으로 측정하였다. Extinction coefficient 1.56 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 을 사용하여 malondialdehyde 양을 계산하였다.

#### 6) 단백질 정량방법 :

단백질 함량은 Lowry 등<sup>9)</sup> 의 방법으로 발색하여 700 nm 에서 Spectrophotometer (spectronic 20, Bauch and Lomb) 로 측정하였다. 표준용액으로는 bovine

serum albumin 을 사용 하였다.

### 실 험 결 과

1) Higenamine 투여가 Hepatic microsomal cytochrome p-450과 b<sub>5</sub> 함량에 미치는 영향 :

13 mg/kg 의 Higenamine 을 흰쥐 복강내로 주사한 hepatic microsomal cytochrome p-450 의 함량은 9.25 ± 0.81 nmoles/mg protein 이고 대조군은 5.63 ± 1.12 nmoles/mg protein 으로 현저히 증가됨을 관찰 할 수 있었다(표 1, 그림 1). 그러나 50 mg/kg 과 100 mg/kg

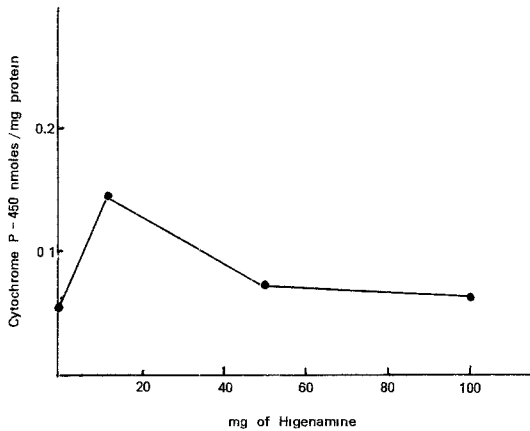


Fig. 1. The level of liver microsomal cytochrome P-450 by higenamine pretreated rats.

Table 1. The level of liver microsomal cytochrome p-450 by higenamine pretreated rats

Group	Cytochrome P-450	
	nmole / 0.1 ml microsome	nmoles / mg protein
Control	6.06 ± 0.68	5.63 ± 1.12
13 mg/kg Higenamine	8.12 ± 0.71	9.25 ± 0.81
50 mg/kg Higenamine	7.95 ± 0.58	8.43 ± 0.70*
100 mg/kg Higenamine	7.25 ± 0.12	7.38 ± 0.14*

\* Significantly different from control value P < 0.01.

Table 2. The level of liver microsomal cytochrome b<sub>5</sub> by higenamine pretrated rats

Group	Cytochrome b <sub>5</sub>	
	nmoles / 0.1 ml microsome	nmoles / mg protein
Control	0.064 ± 0.003	0.060 ± 0.004
13 mg/kg Higenamine	0.131 ± 0.003	0.149 ± 0.004*
50 mg/kg Higenamine	0.073 ± 0.004	0.074 ± 0.007**
100 mg/kg Higenamine	0.061 ± 0.009	0.065 ± 0.010

\* Significantly different from control value P < 0.001

\*\* Significantly different from control value P < 0.01.

투여군은 각각 8.43 ± 0.70 nmoles/mg protein 과 7.38 ± 0.14 nmoles/mg protein 으로 대조군에 비하여는 현저히 증가 되었으나 13 mg/kg 투여군에 비하여는 감소하는 경향이 었다.

Hepatic microsomal cytochrome b<sub>5</sub> 의 함량은 13 mg/kg higenamine 투여군은 0.149 ± 0.004 nmoles/mg protein 으로 대조군 0.060 ± 0.004 nmoles/mg protein 에 비하여 현저히 증가되었었다 ( 표 2, 그림 2).

50 mg/kg 과 100 mg/kg 투여군은 각각 0.074 ± 0.007 nmoles/mg protein 과 0.065 ± 0.010 nmoles/mg protein 으로 대조군에 비하여 증가되었었다.

2) Higenamine 투여가 AAF 의 Ring - 과 N - Hydroxylation 에 미치는 영향 :

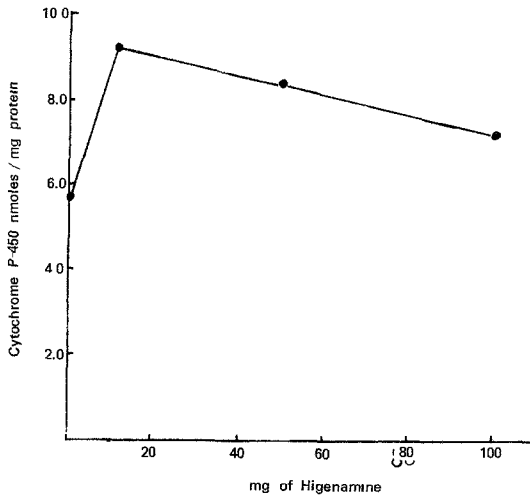
13 mg/kg 의 higenamine 투여군은 AAF 의 Ring 과 N - hydroxylation 이 0.340 ± 0.018 nmoles 과 0.162 ± 0.010 nmoles 로 대조군 0.388 ± 0.037 nmoles 과 0.264 ± 0.025 nmoles 에 비하여 감소하였었다. 50 mg/kg 과 100 mg/kg 투여군에서 Ring - hydroxylation 은 각각 0.306 ± 0.011 nmoles 과 0.142 ± 0.009 nmoles 로 현저히 감소되었었다 ( P < 0.05, P < 0.01 ). N - hydroxylation 은 0.157 ± 0.001 nmoles 와 0.063 ± 0.008 nmoles 로 Ring - hydroxylation 과 같은 경향이 었다 ( P < 0.01 ). 이와같이 higenamine 투여는 cytochrome p - 450 과 b<sub>5</sub> 의 함량이 증가되었으나 AAF 의 Ring - 과 N - hydroxylation 은 감소되었었다.

**Table 3.** Effect of higenamine on Ring- and N -hydroxylation of 2 - acetylaminofluorene by rat liver microsomes

Group	R - OH AAF (nmoles )	N - OH AAF (nmoles )
Control	0.388 ± 0.037	0.264 ± 0.025
13 mg / kg Higenamine	0.340 ± 0.018	0.162 ± 0.010 *
50 mg / kg Higenamine	0.306 ± 0.011 **	0.157 ± 0.001 *
100 mg / kg Higenamine	0.142 ± 0.009 *	0.063 ± 0.008 *

\* Significantly different from control value P < 0.01.

\*\* Significantly different from control value P < 0.05



**Fig. 2.** The level of liver microsomal cytochrome b<sub>5</sub> by higenamine pretreated rats.

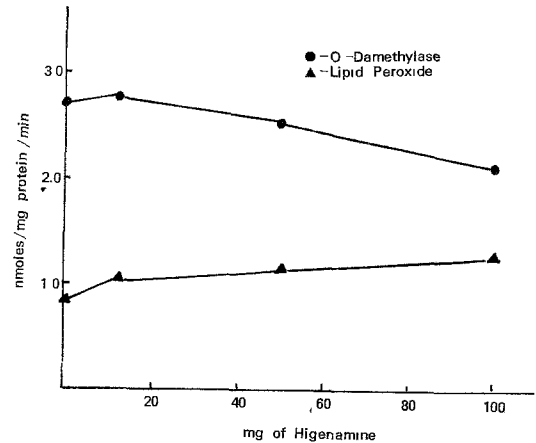
**Table 4.** Effect of higenamine injected I.P. on activity of p - nitroanisole - o - demethylase by rat liver microsomes

Group	O - Demethylase activity (nmoles / mg protein / min )
Control (saline)	2.74 ± 0.32
13 mg / kg Higenamine	2.77 ± 0.35
50 mg / kg Higenamine	2.57 ± 0.21
100 mg / kg Higenamine	2.15 ± 0.07*

\* Significantly different from control value P < 0.01.

3) Higenamine 투여가 P - nitroanisole - O - demethylase 에 미치는 영향 :

13 mg / kg Higenamine 투여군의 p - nitroanisole - o - demethylase 활성은 2.77 ± 0.35 nmoles / mg gprotein / min 으로 대조군의 2.74 ± 0.22 nmoles / min 으로 별 변화가 없었다 ( 표 4, 그림 3). 50 mg / kg 투여군은 2.57 ±



**Fig. 3.** Effect of higenamine injected I.P. on activity of p - nitroanisole - o - demethylase and formation of lipid peroxides by rat liver microsomes.

**Table 5.** Effect of higenamine injected I.P. on lipid peroxidation by rat liver microsomes

Group	Lipid peroxide nmoles / mg protein
Control	0.819 ± 0.013
Higenamine (13 mg / kg)	1.059 ± 0.029
Higenamine (50 mg / kg)	1.121 ± 0.024 *
Higenamine (100 mg / kg)	1.224 ± 0.034 *

\* Significantly different from control value P < 0.01.

0.21 nmoles / mg protein / min 으로 약간 감소하는 경향이었고, 100 mg / kg 투여군은 2.15 ± 0.07 nmoles / mg protein / min. 으로 대조군에 비하여 현저히 감소하였다 (P < 0.01).

4) Higenamine 투여가 Lipid peroxidation 에 미치는 영향

13 mg / kg higenamine 투여군은 1.059 ± 0.029 nmoles /

mg protein/min 으로 대조군  $0.819 \pm 0.013$  nmoles/mg protein/min 로 현저히 증가하였다( 표 5, 그림 3). 그리고 50 mg/kg 투여군도 각각  $1.121 \pm 0.024$  nmoles/mg protein/min 와  $1.224 \pm 0.034$  nmoles/mg protein/min 으로 대조군보다 현저히 감소하였다( $P < 0.01$ ). Higenamine 투여량이 증가함에 따라 lipid peroxide 형성이 증가함을 관찰할 수 있었다.

## 고 찰

많은 약물들은 hepatic microsomal cytochrome p-450 및  $b_5$  그리고 NADPH-cytochrome c reductase 를 유도하거나 자극하는 biotransformation 이 일어나게 된다<sup>11)~14)</sup>. 이런 약물의 biotransformation 은 aliphatic 또는 aromatic 의 O-hydroxylation, O-deethylation, N-demethylation 및 N-oxidation 과 같은 산화반응 그리고 peroxidation, deamination, desulfuration 및 dehalogenation 을 촉매하기 위해서 microsomal cytochrome p-450, NADPH-cytochrome p-450 reductase,  $b_5$  및 flavoprotein 을 필요로 한다<sup>15)~17)</sup>.

Higenamine 은 강심작용으로 그의 많은 약리작용이 밝혀졌으나 간조직 mixed function oxidase system 에 대한 효과는 보고된바 없다.

본 연구는 higenamine 을 흰쥐 복강내로 투여하였을 때 mixed function oxidase system 의 monooxygenase 들의 활성을 측정하였다. 그 결과 hepatic microsomal cytochrome p-450 의 함량변화는 13 mg/kg higenamine 투여량의 증가에 따라 효소 유도를 감소시켰다. 이런 경향은 cytochrome  $b_5$  함량변화도 같았다. 이와같이 higenamine 은 강심작용 뿐만아니라 hepatic microsomal monooxygenase system 의 성분인 cytochrome p-450 과  $b_5$  함량에 미치는 영향을 알 수 있었다.

간 조직 microsome 에는 많은 지용성 화합물과 약물 즉 마취제, hydrocarbon, 지방산, 스테로이드 홀몬 그리고 담즙산 등이 mixed function oxidase 에 의하여 hydroxylation 된다. 이 효소계는 cytochrome p-450, NADPH 및  $O_2$  를 필요로 한다<sup>18)</sup>. Higenamine 투여로 유도된 cytochrome p-450 에 의하여 일어나는 발암현상을 관찰하고자 하여 모델 화합물로 강력한 간 암 물질인 2-AAF 를 사용하였다. 이때 AAF 의 ring-과 N-hydroxylation 은 모두 감소되었다. AAF 의 activation 은 N-OH AAF 가 형성되며 생체내 거대분자인 DNA, RNA 및 단백질과 결합하므로 궁극적으로 발암현상이 일어나게 된다. 반면 Ring-OH AAF 는

monophenol 로써 sulfate 와 glucuronide 를 형성하여 뇨나 담즙에 배설되어 해독 작용을 한다. 이와같이 higenamine 투여로 AAF 의 Ring-과 N-hydroxylation 의 감소는 약물해독작용의 저하를 시사하는 것이다.

약물의 N-demethylation 과 hydroxylation 은 microsomal mixed function oxidase system 과 cytochrome  $b_5$  가 관여 한다고 보고된바 있다<sup>19)20)</sup>. 저농도의 Higenamine 투여로 p-nitroanisole-o-demethylase 활성은 증가되었고, higenamine 투여량을 증가시키면 O-demethylase 의 활성이 감소되었다. 이런 O-demethylase 활성과 cytochrome  $b_5$  함량은 같은 경향으로 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

Lipid peroxidation 에 의한 주요한 손상부위는 bio-membrane 과 subcellular organelle 이며 이는 oxygen 과 lipid 의 직접적인 반응으로 free radical 중간산물과 semistable peroxide 를 생성하게 된다<sup>21)22)</sup>. Higenamine 의 투여량이 증가함에 따라 lipid peroxide 의 형성이 증가하는 경향이였다. 이는 microsomal 막과 mixed function oxidase system 의 손상에서 오는 결과라 생각된다.

## 결 론

흰쥐 복강내로 higenamine 투여후 hepatic microsomal mixed function oxidase system 의 cytochrome p-450 과  $b_5$  의 함량 및 p-nitroanisole-o-demethylase 활성을 측정하였고, AAF 의 Ring-과 N-hydroxylation 그리고 lipid peroxidation 을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 흰쥐 복강내로 13 mg/kg higenamine 투여로 hepatic microsomal cytochrome p-450 과  $b_5$  의 함량은 대조군에 비하여 현저히 증가되었다. 그러나 higenamine 투여량이 증가함에 따라 유도된 양은 감소되었다.

2) AAF 의 ring-과 N-hydroxylation 은 모두 대조군에 비하여 현저히 감소되었다. 그리고 higenamine 투여량이 증가함에 따라 감소폭은 더욱 증가하였다.

3) p-Nitroanisole-o-demethylase 활성은 higenamine 투여량이 증가함에 따라 감소되었다.

4) Lipid peroxide 형성은 higenamine 투여량이 증가함에 따라 증가되었다.

이상과 같은 결과로 higenamine 은 강심작용과 동시에 hepatic microsomal mixed function oxidase system 에 영향이 있음을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) 김종원 · 이태희 · 이경순 · 이인환 · 정명현 · 정시련 · 한덕용 · 조필형 : 현대생약학, 서울, 진명출판사, 1980; 제 4 장, 제 1 절
- 2) Kosuge T, Yokota M, Nagasawa M: Studies on cardiac principles on Aconite roots. I. Isolation and structural determination of higenamine. *Yakigaku Zasshi*, 1978; 98 : 1370.
- 3) 권평중 · 조성일 · 엄대용 · 이상돈 : Higenamine 이 심근의 활동전압 및 수축에 미치는 영향. *중앙의대지*, 1981; 6 : 543.
- 4) Park CW, Chang KC and Lim JK: Effects of Higenamine on isolated heart adrenoceptor of rabbit. *Arch Int Pharmacodyn. Ther*, 1984; 267 : 279.
- 5) Lotlikar PD, Wertman K, and Luba L : Role of mixed function amine oxidase in N-hydroxylation of 2-AAF by hamster liver microsomal preparations. *Biochem J* 1973; 136 : 1137.
- 6) 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.
- 7) Smucklers EA, Arrhenius E and Hulton T : Alterations in microsomal electron transport oxidative N-demethylation and azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine induced liver injury. *Biochem J* 1967; 103 : 55.
- 8) Netter KJ and Seidel G : An adaptively stimulated O-methylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J pharmacol. Exptl Therp*, 1964; 146 : 61.
- 9) Buege JA and Aust SD : Microsomal lipid peroxidation (Eds. colowick sp and kaplan ND), *Methods in Enzymology*, New York Academic Press. 1978; 52 : 302.
- 10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193 : 265.
- 11) Conney AH : Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev* 1967; 19 : 317.
- 12) Ullrich V, Roots I, Hildebrandt A, Estabrooke RW and Conney AH (Eds): *Microsomes and drug oxidations*, Proc hird Int symp Berlin 1976. Pergamon Press Oxford, 1977.
- 13) Jernia D (Ed) : *Drug metabolism concepts*, Acs symp series 44, American chemical society, Washington DC, 1977.
- 14) Sato R and Omura T (Eds): *Cytochrome p-450 Dondensha*, Tokyo, 1978.
- 15) Datta RK, Johnson EA and Stenger RJ : Effects of morphine sulfate on NADPH - cytochrome c reductase and cytochrome p-450 of mouse liver microsomes. *Arch Int pharmacodyn Ther* 1976; 223: 180.
- 16) Coon JM and Persson VA : In *Enzymatic basis of detoxification* (Ed. Jakoby WB). Academic Press, New York, 1980; pp 117.
- 17) Gelboin HV : *Physiological Review*. Bethesda, Maryland, 1980; 60:1107.
- 18) Lotlikar PD, Hong YS and Baldy WJ : Cytochrome P-450 dependent N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene (Ed. Gorrod JW). *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, New York, 1978; pp 185.
- 19) Ortizde Montellano PR and Mico BA : Destruction of cytochrome P-450 by ethylene and other olefins. *Molec. Pharmac*, 1980; 18:128.
- 20) Sugiyama J, Miki N and Yamano T : The obligatory requirement of cytochrome b<sub>5</sub> in the P-nitroanisole-O-demethylation reaction catalyzed by cytochrome P-450 with a high affinity for cytochrome b<sub>5</sub>. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1979; 90 : 715.
- 21) Ham YA, Hong YS and Sung NE : The Effects of vitamin antioxidants on lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Ewha Med J* 1982; 5 : 109.
- 22) Hong YS, Ham YA and Sung NE : The effects of vitamin A and E on lipid peroxidation in ethanol administered rat liver microsomes. *Ewha Med J* 1984; 7 : 3.