

광선조사가 신생 흰쥐의 Cytochrome 효소계와 Riboflavin에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 소아과

(지도 : 성 낙 응* 교수)

이 승 주

= ABSTRACT =

The Effects of Phototherapy Lights on the Cytochrome Enzyme System and Riboflavin Status in the Newborn Rats

Lee, Seung Joo M.D.

(Director: Professor, Nak Eung Sung, M.D., Ph. D)

Department of Pediatrics, College of Medicine, Ewha Womans University

The effectiveness of phototherapy in the treatment of neonatal hyperbilirubinemia is so established that it is widely used without serious side effects. The widespread use of phototherapy has caused some concern since substances other than bilirubin may be photoactivated or photodecomposed. The toxic properties of these photoactivated substances might prove to be more harmful to the neonatal infants than bilirubin.

The purpose of the present study was to investigate the photodynamic metabolic effects on the hepatic microsomal cytochrome P-450, cytochrome b₅, riboflavin status, hepatic microsomal DNA and RNA of newborn rats at 1 week and 3 weeks of illumination by phototherapy lights.

The results are as follows:

1) Activities of hepatic microsomal cytochrome P-450 and cytochrome b₅ in newborn rats increased significantly at 3 weeks of illumination by phototherapy lights.

2) Induced cytochrome P-450 by phototherapy lights increased the ring-hydroxylation of AAF. more significantly ($P < 0.001$) than the N-hydroxylation ($P < 0.01$).

3) Erythrocyte glutathione reductase activity coefficient as a measure of ribo-

* 이화여자대학교 의과대학 생화학교실

flavin status increased significantly ($P < 0.05$) at 1 and 3 weeks of illumination by phototherapy lights, and this means the riboflavin deficiency due to the photodecomposition of riboflavin by phototherapy lights.

4) The quantitative measurement of hepatic microsomal DNA and RNA showed no significant change by phototherapy lights.

서 론

혈청 빌리루빈을 감소시키는 광선의 효과가 Cremer 등¹⁾과 Lucy 등²⁾의 임상보고에서 입증되었다. 그로부터 광선요법은 신생아 고빌리루빈혈증 치료에 광범위하게 이용되고 있으나 그 안전성과 부작용에 대해서는 아직도 많은 논란이 되고 있다³⁾. 미국 광선요법위원회⁴⁾의 Behrman⁴⁾은 많은 임상경험을 종합할때 일시적이고 가벼운 부작용은 흔히 있으나 심하고 영구적인 부작용은 Noell 등⁵⁾이 보고한 망막의 손상외에는 거의 없다고 하였다. 그러나 Cohen 등⁶⁾은 최근의 각종 실험 보고를 통해 광선이 빌리루빈의 생체대사에 중요한 물질들을 광활성 또는 광분해할 수 있다고 하였다. 또한 Laustriat 및 Hasselman⁷⁾은 체내 단백질과의 광반응, Gromisch 등⁸⁾, Tan 등⁹⁾은 광선에 민감한 비타민인 riboflavin의 광분해현상, Speck 등¹⁰⁾, Speck 및 Rosenkranz¹¹⁾는 DNA 손상등을 보고하면서 이들이 성장을 저지하거나 발암성물질로 작용할지도 모를 만기후 유증의 가능성을 제시하였다.

이에 저자는 광선요법이 생체 각종대사에 미치는 영향을 관찰하고자 광선요법시 사용하는 백색형광등을 이용하여 신생 흰쥐에 일정기간 광선을 조사한 후 간조직내 microsomal mixed function oxidase 계의 주요효소인 cytochrome P-450 과 cytochrome b₅의 변화를 측정하였다. 동시에 유도된 cytochrome P-450 이 간의 약물대사에 미치는 영향을 관찰하고자 간암의 발암원으로 알려진 AAF를 모델 화합물로 그의 대사산물인 ring-OH AAF와 N-OH AAF를 측정하였고 한편으로는 광선에 민감한 비타민인 riboflavin의 광분해현상 및 hepatic microsomal DNA와 RNA의 함량변화를 관찰한 바 의의있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

A. 실험재료

1) 실험동물

건강한 흰쥐 (Wister strain)에서 갓 태어난 신생 흰

쥐 200마리를 실험에 사용하였다.

2) 실험기구

- (1) Potter Elvehjem homogenizer.
- (2) High speed refrigerate centrifuge: Damon/Model ice B-20A.
- (3) Ultracentrifuge: Beckman/Model LB-80.
- (4) Spectrophotometer: Varian SP-624.
- (5) Spectronic 20: Banch and Lomb.
- (6) Liquid scintillation counter: Packard Tri-CARB 300 CD.

3) 실험시약

- (1) [$^9-^{14}C$] AAF (0.2 μ Ci): New England Nuclear 사 제품.
- (2) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH): Boehringer Mannheim Biochemicals 사 제품.
- (3) Flavin adenine dinucleotide (FAD): Sigma 사 제품.
- (4) Oxidized glutathione (GSSG): Sigma 사 제품.
- (5) Deoxyribonucleic acid (DNA): Sigma 사 제품.
- (6) Ribonucleic acid (RNA): Sigma 사 제품.
- (7) Bovine serum albumin. Sigma 사 제품.
- (8) Orcinol reagent diphenylamine reagent: reagent grade.
- (9) Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA): reagent grade.
- (10) N-2-hydroxyethylpiperazine-N¹-2-ethanesulfonic acid (HEPES): Sigma 사 제품.
- (11) ACD 용액: 7.3g anhydrous citric acid, 22 g sodium citrate \cdot 2H₂O, 24.5g glucose \cdot H₂O를 1ℓ의 증류수에 용해시킨 용액.

B. 실험방법

1) 광선조사법

신생아 고빌리루빈혈증 치료에 널리 사용되고 있는 광선요법시와 같은 광선조사를 시행하여 광선조사를 받지 않은 대조군과 비교하였다. 광원은 20 Watt 백색형

광등 8개를 사용하였고 광원과 실험동물과의 거리는 56cm로 하였으며 광원의 강도는 4000 조도를 유지하도록 하였다. 광선의 파장범위는 425mm~475mm로서 빌리루빈이 최고흡수력을 보이는 450nm를 중심파장으로 하였고 파장이 짧은 자외선을 차단하기 위하여 Plexiglas shield를 사용하였다. 광선조사는 지속적으로 시행하였으며 조사기간 1주와 3주후에 실험동물을 단두하여 혈액을 채취하고 개복한 후에 간조직을 적출하였다.

2) Microsome의 분리법

Microsome의 분리는 Lotlikar 등¹²⁾의 방법으로 시행하였다. 절제한 간조직을 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose 용액으로 25% 균질용액을 만든 후 냉동원침기로 8000×g에서 10분간 원심분리하여 핵, mitochondria 및 조직 침전물을 제거하였다. 이 상층액을 다시 10500×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 0.25M sucrose 용액으로 1g/1ml의 균질용액을 만들었다.

3) Cytochrome P-450의 활성측정법

Microsomal cytochrome P-450의 활성측정은 Omura와 Sato¹³⁾의 방법으로 CO gas에 의하여 환원된 물질의 흡광도를 spectrophotometer를 사용하여 450nm와 490nm에서 측정하였으며 이때 molar extinction coefficient는 $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

4) Cytochrome b₅의 활성측정법

Cytochrome b₅의 활성측정은 Smuckler 등¹⁴⁾의 방법으로 Cytochrome b₅의 환원형과 산화형사이의 흡광도를 409nm와 424nm에서 측정하였으며 이때 molar extinction coefficient는 $185\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

5) Ring-OH와 N-OH AAF의 측정법

Ring과 N의 hydroxylation된 AAF의 정량은 Lotlikar 등¹²⁾의 방법으로 시행하였다. AAF의 ring과 N의 hydroxylation을 위하여 50mM HRPES buffer (pH, 7.8), 0.1mM (⁹14C) AAF, 2mM NADPH 및 microsomal fraction을 가한 medium (Table 1)으로 37°C에서 30분간 incubation하였다. Incubation 후에 각 시험관에는 4ml의 icy cold IM sodium acetate buffer (pH 6.0)를 가하여 반응을 중지시키고 즉시 diethylether를 가하여 hydroxylation된 대사를 추출하였다. Ring과 N에 hydroxylation된 AAF는 cyclohexane : t-butanol : acetic acid : H₂O가 18 : 2 : 2 : 1인 용매를 사용하여 paper chromatography로 분리하고 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하여

Table 1. Incubation medium for AAF hydroxylation

HEPES buffer, PH 7.8	50mM
NADPH	2mM
AAF containing 0.2 μCi (⁹ 14C-AAF)	0.1mM
Various microsomal fractions as indicated water	
to a final volume of 1.0ml	
Incubated in air for 30min. at 37°C.	

그 함량을 계산하였다.

6) Riboflavin 측정법

Riboflavin측정은 Cooperman 등¹⁵⁾의 방법으로 hemolyzate의 적혈구 glutathione reductase activity coefficient를 측정하였다. 혈액 5ml에 1.5ml의 ACD 용액을 가하고 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 적혈구를 분리한 후 30분간 냉장고에 방치하였고 다시 1500rpm에서 15분간 원심분리하여 hemolyzate를 만들었다. 2개의 sample 시험관과 2개의 blank 시험관에 0.6ml의 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.4, 0.1ml의 40mM EDTA, 0.1ml의 3.7mM GSSG 및 0.05ml의 hemolyzate를 가하였다. 그리고 각 1개의 sample과 blank 시험관에 0.1ml의 0.14mM FAD를 첨가하여 37°C에서 8분간 preincubation하였다. 그 후 2개의 sample 시험관에 0.1ml의 1.9mM NADPH를 가하고 증류수로 1.1ml가 되게 희석시킨 후 spectronic 20을 사용하여 340nm에서 blank 시험관을 0에 맞추어 후 흡광도를 측정하여 그 흡광도의 차로서 activity coefficient (A.C.)를 계산하였다.

7) Hepatic microsomal DNA와 RNA 정량법

적출한 간조직에서 microsome을 분리하고 2ml의 microsome에 1ml의 20% TCA와 1ml의 증류수를 가하고 20분간 방치 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하였으며 그 침전물에 다시 3ml의 5% TCA를 가하고 90°C 수욕에서 30분간 가열하여 다시 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상층액을 DNA와 RNA 정량에 사용하였다. DNA정량은 상층액 2ml에 diphenylamine 4ml를 가하여 100°C 수욕에서 10분간 가열한 후 실온으로 식혀 600nm에서 흡광도를 측정하였으며 이때 기준으로는 소의 흉선에서 분리한 DNA를 사용하였다. RNA정량은 상층액을 증류수로 10배 희석하여 그 희석액 2ml에 orcinol 2ml를 가하여 100°C 수욕에서 15분간 가열한 후 실온으로 식혀 660nm에서 흡광

도를 측정하였으며 이때 기준으로는 효모 RNA 를 사 용하였다.

실 험 결 과

A. 광선조사가 신생원쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450 과 cytochrome b₅ 에 미치는 영향

광선조사가 신생원쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450 에 미치는 영향은 Table 2-a 에서 보는 바와 같이 광선조사 1 주군에는 1.509 ± 0.055 nmoles / mg protein 으로 광선조사를 받지 않은 대조군의 1.514 ± 0.032 nmoles / mg protein 에 비해 큰 변화가 없었으나 3 주군에서는 2.785 ± 0.213 nmoles / mg protein 으로 대조군에 비해 유의있는 증가를 보였다 (P < 0.001).

Hepatic microsomal cytochrome b₅ 에 대한 광선의 영향도 Table 2-b 에서 보는 바와 같이 광선조사 1 주군에는 0.057 ± 0.014 nmoles / mg protein 으로 대조군의 0.057 ± 0.003 nmoles / mg protein 에 비해 큰 변화가 없었으나 3 주군에서는 0.084 ± 0.005 nmoles / mg protein 으로 대조군에 비해 유의있는 증가를 보였다 (P < 0.001).

이상과 같이 광선조사가 간조직내 mixed function oxidase system 의 주요 효소들을 증가시키는 것을 관찰하였다.

B. 광선조사에 의해 유도된 hepatic microsomal 효소가 AAF 의 hydroxylation 에 미치는 영향

신생원쥐에서 광선조사에 의해 유도된 hepatic microsomal cytochrome P-450 이 AAF 의 hydroxylation 에 미치는 영향은 Table 3 에서 보는 바와 같이 광선조사 1 주군에는 ring-OH AAF 0.407 ± 0.109 nmoles / mg protein, N-OH AAF 2.220 ± 0.078 nmoles / mg protein 으로 광선조사를 받지 않은 대조군의 ring-OH AAF 0.365 ± 0.078 nmoles / mg protein, N-OH AAF 0.216 ± 0.015 nmoles / mg protein 에 비해 별 변화가 없었으나 3 주군에서는 ring-OH AAF 가 0.855 ± 0.188 nmoles / mg protein 으로 대조군에 비해 두배 이상의 유의있는 증가를 보였다 (P < 0.001), N-OH AAF 도 0.297 ± 0.054 nmoles / mg protein 으로 대조군에 비해 증가하였다 (P < 0.01). 즉 광선조사에 의해 유도된 hepatic microsomal cytochrome P-450 은 AAF 의 활성화과정인 N-hydroxylation 도 어느정도 증가시키나 비활성화과정인 ring-hydroxylation 을 더욱 더 증가시켜 정상대사를 촉진시킴을 관찰하였다.

C. 광선조사가 신생원쥐의 riboflavin 에 미치는 영향
Riboflavin 의 상태를 관찰하기 위하여 신생원쥐의 적혈구 glutathione reductase activity coefficient 를 측정하였던 바 Table 4 에서 보는 바와 같이 광선조사 1

Table 2-a. Effects of phototherapy lights on hepatic microsomal cytochrome P-450

Group	Cytochrome P-450	
	nmoles/0.1ml microsome	nmoles/mg Protein
Control	3.256 ± 0.069	1.514 ± 0.032
Light illumination (1 week)	2.964 ± 0.292	1.509 ± 0.055
Light illumination (3 weeks)	5.776 ± 0.708*	2.785 ± 0.213*

Each value represents mean ± S.D. of 8 experiments.

* Significantly different from control value P < 0.001.

Table 2-b. Effects of phototherapy lights on hepatic microsomal cytochrome b₅

Group	Cytochrome b ₅	
	nmoles/0.1ml microsome	nmoles/mg protein
Control	0.123 ± 0.007	0.057 ± 0.003
Light illumination (1 week)	0.109 ± 0.014	0.057 ± 0.057
Light illumination (3 weeks)	0.176 ± 0.006*	0.084 ± 0.005

Each value represents mean ± S.D. of 8 experiments.

* Significantly different from control value P < 0.001.

Table 3. Effects of phototherapy lights on the ring- and N-hydroxylation of AAF

Group	Ring-OH AAF nmoles/mg protein	N-OH AAF nmoles/mg protein
Control	0.365 ± 0.078	0.216 ± 0.105
Light illumination (1 week)	0.407 ± 0.109	0.220 ± 0.078
Light illumination (3 weeks)	0.855 ± 0.188**	0.297 ± 0.054*

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments.

* Significantly different from control value P < 0.01.

** Significantly different from control value P < 0.001.

Table 4. Effects of phototherapy lights on riboflavin

Group	Erythrocyte Glutathione Reductase Activity Coefficient
Control	1.072 ± 0.114
Light illumination (1 week)	1.226 ± 0.143
Light illumination (3 weeks)	1.301 ± 0.281*

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments.

* Significantly different from control value P < 0.05.

주군에서 1.226 ± 0.143, 3 주군에서 1.301 ± 0.281 로 광선조사를 받지 않은 대조군의 1.072 ± 0.114 에 비해 의 있게 증가되어 (P < 0.05) riboflavin 결핍상태를 나타냈으며 이는 광선조사에 의한 riboflavin 의 광분해 현상으로 생각된다.

D. 광선조사가 신생 흰쥐의 hepatic microsomal DNA 와 RNA 함량에 미치는 영향

광선조사가 hepatic microsomal DNA 에 미치는 영향은 Table 5-a 에서 보는 바와 같이 광선조사 1 주군에는 0.180 ± 0.041mg/mg protein, 3 주군에는 0.182 ± 0.078mg/mg protein 으로 광선조사를 받지 않은 대조군의 0.174 ± 0.003mg/mg protein 에 비해 유의한 차이가 없었다.

광선조사가 hepatic microsomal RNA 에 미치는 영향도 Table 5-b 에서 보는 바와 같이 광선조사 1 주군에는 0.175 ± 0.041mg/mg protein, 3 주군에는 0.193 ± 0.030mg/mg protein 으로 대조군의 0.172 ± 0.022mg/mg protein 에 비해 유의한 변화가 없었다.

고 안

광선요법은 Cremer 등¹⁾, Lucy 등²⁾의 임상보고 이래

Table 5-a. Effects of phototherapy lights on the hepatic microsomal DNA

Group	DNA	
	mg/ml microsomes	mg/mg protein
Control	1.726 ± 0.063	0.174 ± 0.003
Light illumination (1 week)	1.851 ± 0.095	0.180 ± 0.041
Light illumination (3 weeks)	1.913 ± 0.307	0.182 ± 0.078

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments.

Table 5-b. Effects of phototherapy lights on the hepatic microsomal RNA

Group	RNA	
	mg/ml microsomes	mg/mg protein
Control	3.667 ± 0.467	0.171 ± 0.022
Light illumination (1 week)	3.691 ± 0.483	0.175 ± 0.044
Light illumination (3 weeks)	3.783 ± 0.614	0.193 ± 0.031

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments.

신생아고빌리루빈혈증 치료에 큰 부작용없이 광범위하게 쓰여져 왔다. 미국 광선요법위원회 Behrman⁴⁾은 Noell 등⁵⁾이 보고한 눈에 대한 손상외에는 모두 일시적이고 가벼운 증상뿐이라고 그 안전성을 보고하였으나 그 후 John³⁾, Drew 등⁶⁾, Cohen 및 Ostro⁶⁾는 광선요법시 빌리루빈의 체내물질이 광활성화 될 수 있으며 이런 광활성화된 물질이 성장중의 동물에 해로운 영향을 미칠 가능성이 있으므로 더 많은 장기 추적관찰에 의한 안전성이 보고될 때까지 불필요한 광선요법의 남용은 고려해야만 한다고 하였다. 생체밖 광반응중에는 체내단백질의 광분해현상이 보고된 바 Laustriat 및 Hasselman⁷⁾은 광선의 직접적인 흡수나 광선에 의해 형성된 singlet oxygen에 의한 산화작용으로 aaromatic amino acid의 aromatic ring이 파괴됨을 보고하였고 Girotti¹⁷⁾는 singlet oxygen에 의한 산화작용으로 적혈구내 많은 효소의 불활성화 또는 단백질의 cross linking을 보고하였다. Yeary 등¹⁸⁾은 광선에 의한 흰쥐의 microsomal uridine 5'-diphosphateglucuronyl transferase activity의 증가를 보고하였고 Pannatier 등¹⁹⁾은 광선에 의한 피부내의 microsomalcytochrome P-450의 활성증가를 보고하였으며 Paine 및 McLean²⁰⁾은 광선에 의해 형성된 superoxide anion이 간세포의 cytochrome P-448을 활성화시킴을 보고하였다. 광선이 체내 단백질에 미치는 이와같은 영향을 관찰하기 위하여 간조직의 microsome내에서 많은 물질의 활성화와 해독작용등 주요 대사과정에서 전자전달계로 작용하는 mixed function oxidase 또는 monooxygenase라고 부르는 주요산화효소의 주성분인 cytochrome P-450과 cytochrome b₅에 대한 광선조사의 영향을 조사한 저자도 광선이 신생흰쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450과 cytochrome b₅의 활성을 의의 있게 증가시킴을 관찰하였다. 그러나 cytochrome P-450은 여러 분자형이 존재하며 이들 상이한 분자형태들의 기질특이성이 입증되었으며²¹⁾, 유발인자의 종류에 따라서도 독특한 기질을 나타낸다고 하였다²²⁾. 또한 이들이 간세포에서 화학적 발암물질을 포함한 수많은 xenobiotics의 활성화와 해독작용에도 각각 다양한 기질을 나타내며 이러한 독특한 기질특이성이 때로는 해독작용을 하기도 하고 때로는 독성이나 carcinogenic 특성을 발휘하기도 한다는 것은 잘 알려진 사실이다^{23/24)}. 저자는 광선조사에 의해 유도된 cytochrome P-450의 기질특이성을 관찰하기 위하여 간암의 발암원으로 잘 알려진 AAF를 모델화합물로 사용하여 NADPH와 산소의 존재하에서 광선조사에 의해 유도된 hepatic microsomal cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase system이 AAF의 비활성화과정인 ring

-hydroxylation과 활성화과정인 N-hydroxylation²⁵⁾에 미치는 영향을 조사한 바 간독성을 나타내는 N-hydroxylation에 비해 비활성화과정인 ring-hydroxylation이 월등히 증가함을 관찰하였으며 이는 형성된 ring-OH AAF가 Sulfate나 glucuronide와 결합해서 담즙이나 뇨로 배설되는 정상대사가 촉진되는 과정이라 하겠다.

또 다른 생체밖 광반응으로는 광선과 Photosensitive vitamin과의 반응이라 하겠다. Damelle는 망막의 photosensitive vitamin인 retinal이 광선에 노출시 형성된 singlet oxygen에 의해 자가감각 및 자가산화물 일으켜 망막의 손상이 발생된다고 하여 광선요법시 안대에 의한 눈의 보호를 강조하였다. 또 다른 photose-sensitive vitamin은 riboflavin이며 Kostembauder 및 Sanvordeker²⁷⁾은 광선요법시 riboflavin도 빌리루빈의 최고 흡수파장인 450nm에서 똑같이 최고급 흡수력을 가져 singlet oxygen을 형성하며 이는 빌리루빈의 광분해를 한층 더 촉진시킨다고 하여 광활성화된 riboflavin의 추가적인 치료효과를 보고하였다. 그러나 Gromisch 등⁸⁾과 Tan 등⁹⁾은 많은 효소계에 보조효소로 작용하는 riboflavin이 각종 광화학반응의 광수용체 (photoreceptor)로 작용하여 그 자신도 빌리루빈처럼 광산화를 통한 광분해를 일으켜 riboflavin결핍상태를 초래하며 이런 결핍상태가 glutathione reductase 등, 각종대사에 관여하는 효소계의 활성도를 저하시켜 용혈을 일으키는등 성숙기의 신생아에게 매우 해로운 대사장애를 초래할 수 있다고 하였다. Hovi 등²⁸⁾은 이와 같은 riboflavin결핍상태가 riboflavin 함유량이 낮은 모유수유 신생아와 72시간이상 장기조사군에서 더욱 더 문제가 된다고 하였다. 저자도 신생흰쥐의 동물실험에서 광선조사에 의한 riboflavin결핍상태를 관찰하고자 riboflavin의 존효소인 적혈구내 glutathione reductase의 FAD 포화정도를 측정하여 glutathione reductase activity coefficient를 계산한 바 광선조사 1주군과 3주군에서 의의있는 증가를 보여 광선조사가 riboflavin 파괴에 미치는 영향을 인지할 수 있었다. Tan 등⁹⁾, Hovi 등²⁸⁾은 FMN, FAD 등의 형태로 체내주요 대사 과정에 보조효소로 작용하는 riboflavin의 이와같은 결핍상태가 매우 해로운 대사장애를 초래하므로 riboflavin 보충의 필요성을 제시하였다. Patel 및 Pauer²⁹⁾는 장기간 riboflavin결핍이 흰쥐의 NADPH, cytochrome C reductase, cytochrome b₅, cytochrome P-450, flavin 등 microsome내 전자전달계에 관여하는 효소를 감소시켜 aminopyrine, aniline 등의 demethylation과 hydroxylation을 억제한다고 하였으나 Catz 등³⁰⁾은 riboflavin결핍이 이유기 흰쥐에서 cytochrome P-

450의 증가와 aniline 등의 산화반응을 약간 증가시켰다고 하였으며 홍등³¹⁾도 riboflavin 첨가시 AAF의 hydroxylation이 오히려 억제된다고 하여 riboflavin이 각종대사에 관여하는 microsome 내의 효소에 미치는 영향은 아직도 확실치 않으며 본 실험에서도 광선조사에 의하여 초래된 riboflavin 결핍상태가 hepatic microsomal cytochrome P-450과 cytochrome b₅의 증가에 어느정도 기여했는지 또 AAF의 hydroxylation에 어떻게 관여했는지는 또 다른 실험적 연구가 필요하다고 생각된다.

최근에는 광선요법에 의한 riboflavin의 파괴외에도 광선자체나 광활성화된 riboflavin이 세포내 DNA 변형을 일으킨다고 하였다. Speck 등³²⁾은 광선요법시 사용하는 백색형광광선이 생체 밖에서 사소한 DNA손상을 일으키고 이에 따른 DNA 재생과정에서 DNA의 미세구조가 변형될 수 있다고 하였으며 Santella 등³³⁾은 간헐적인 광선요법의 경우 error-prone한 DNA 재생효소가 급격히 증가할 수 있으며 이것이 세균이나 포유동물에서 돌연변이를 증가시키고 carcinogenesis로 작용하므로 간헐적인 광선요법의 위험성을 제시하였다. Sideris 등³⁴⁾은 상표화되어 있는 백색형광등에서 방사되는 광선이 DNA 파괴, sister chromatid exchange, 및 치명적인 손상등을 일으킴을 관찰 보고하였고 Bradley 및 Sharkey³⁵⁾는 형광광선에 의한 DNA strand breaking activity와 돌연변이를, Gandt 등³⁶⁾은 DNA cross linkage와 chromatid breaks 등을 관찰 보고하였다. 또한 광활성화된 riboflavin이 DNA에 미치는 영향을 관찰한 Speck 등¹⁰⁾¹¹⁾³²⁾은 450nm의 광선조사에서 광활성화된 riboflavin이 생체 밖에서 singlet oxygen을 생성하는 강력한 photosensitizer로 작용하여 Hela 세포의 DNA나 정제된 DNA의 deoxyguanosine를 광산화시켜 buoyant density를 증가시키고 침전계수를 감소시키며 thermal helix-coil transition(T_m)의 온도를 감소시키는 물리화학적 변형을 가져온다고 하였으며 Ennever 및 Speck³⁷⁾³⁸⁾는 singlet oxygen의 형성없이도 광활성화된 riboflavin 자체가 DNA와 공유결합을 일으켜 DNA 변형을 초래한다고 하였으며 이 변형된 DNA로부터 돌연변이 또는 암이 야기될 수 있다고 하였다. 본 연구에서 관찰한 hepatic microsomal DNA와 RNA의 함량에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났지만 앞으로 DNA 분자의 미세구조에 미치는 영향에 대한 세밀한 연구가 필요하리라 생각된다.

이상과 같이 광선요법시 사용하는 백색형광광선(파장범위 425nm~475nm)이 그 자체로서 또는 광활성화된 riboflavin을 통하여서 DNA 변형을 일으킨다는 것

을 고려할 때 비록 생체 밖 현상이지만 생체내에서도 일어날 가능성이 있으므로 Tan 등⁹⁾, Hovi²⁸⁾ 등이 제안한 광선요법시 파괴된 riboflavin의 보충문제는 논란의 여지가 있으며 광선요법이 신생아 고빌리루빈혈증 치료에 입증된 효과를 감안할때 Vecchi 등³⁹⁾이 제안한 인체에 해가 적은 파장의 광선인 녹색광에 대한 계속적인 연구도 필요하리라 생각된다.

결 론

광선요법시 사용하는 백색형광등(파장범위 425nm~475nm)에 의한 광선조사가 신생원쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450, cytochrome b₅, AAF의 ring-과 N-의 hydroxylation, riboflavin 및 hepatic microsomal DNA와 RNA 함량에 미치는 영향을 광선조사 1주군과 3주군에서 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 신생원쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450과 cytochrome b₅ 함량에 있어서 광선조사 1주군에서는 큰 변화가 없었으나 3주군에서는 대조군에 비해 유의있는 증가를 보였다 (P<0.001).

2) 유도된 cytochrome P-450은 간암의 발암원으로 알려진 AAF의 활성화과정인 N-hydroxylation도 유의있게 증가시켰으나 (P<0.01), 비활성화과정인 ring-hydroxylation을 더욱 더 유의있게 증가시켜 (P<0.001) 정상대사를 촉진시킴을 관찰하였다.

3) 신생원쥐의 적혈구 glutathione reductase activity coefficient는 광선조사 1주군과 3주군에서 대조군에 비해 유의있게 증가되어 (P<0.05) riboflavin 결핍상태를 반영했으며 이는 광선조사에 의한 riboflavin의 광분해 현상으로 생각된다.

4) 신생원쥐의 hepatic microsomal DNA와 RNA의 함량에 있어서는 광선조사 1주군과 3주군에서 유의있는 변화가 없었다.

REFERENCES

- 1) Cremer RJ, Perryman PW, and Richards DH. Influences of light on the hyperbilirubinemia of infants. *Lancet*, 1958; 1: 1094-1097.
- 2) Lucy JF, Ferreiro M, and Hewitt J. Prevention of hyperbilirubinemia of prematurity by phototherapy. *Pediatrics* 1968; 41: 1047-1054.
- 3) John E: Complication of phototherapy in neonatal hyperbilirubinemia, *Aus Ped J* 1957

- ; 84: 135-147.
- 4) Behrman RE: Preliminary report of the committee on phototherapy in the newborn infants, *J Ped* 1974; 84: 135-147.
 - 5) Noell WK, Walker VS, Kang BS and Borman S: Retinal damage by light in rats. Investigative, *Ophthalmology* 1966; 5: 450-454.
 - 6) Cohen AN and Ostroff JD: New concepts in phototherapy: Photoisomerization of bilirubin IX and potential toxic effects of light, *Pediatrics*, 1980; 65: 740-750.
 - 7) Laustriat G, and Hasselman C: Photochemistry of Protein. *Photochem Photobiol* 1975; 22:295-298.
 - 8) Gromisch DS, Lopez R, Cole HS and Cooperman JM: Light (phototherapy) induced riboflavin deficiency in the neonate. *J Ped* 1977; 90: 118-122.
 - 9) Tan KL, Chow MT and Karrim SM: Effect of phototherapy on neonatal riboflavin status. *J of Ped* 1978; 93: 494-497.
 - 10) Speck WT, Chang CC, and Rosenkranz HS : In vitro studies of effects of light and riboflavin on DNA and Hella cells. *Ped Res* 1975; 9: 150-158.
 - 11) Speck WT and Rosenkranz HS: Intracellular deoxyribonucleic acid modifying activity of phototherapy lights, *Ped Res.* 1976; 10: 553-555.
 - 12) Lotlikar PD, Enomoto M, Miller JA and Miller EC: Species variation in the N- and ring-hydroxylation of 2-AAF and effects of 3-MC pretreatment, *Proc Soc Exp Biol. Med* 1967; 125: 341-346.
 - 13) Omura T and Sato R: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, *J Biol Chem*, 1964; 239: 2379-2385.
 - 14) Smuckler EA, Arrhenius E and Hulton T: Alteration in microsomal electron transport oxidative N-methylated and azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine induced liver injury, *Biochem J* 1967; 103: 55-64.
 - 15) Cooperman JM, Cole HS, Gordon M and Lopez R: Erythrocyte glutathione reductase as a measure of riboflavin nutritional status of pregnant woman and newborn, *Proc Soc Exp Biol Med*, 1973; 143: 326-328.
 - 16) Drew JH, Marriage KJ, Bayle VV, Bajraszewski E and McNamara JM: Phototherapy, short and long-term complication, *Arch of Dis in childhood*, 1976; 51: 454-458.
 - 17) Girotti AW: Bilirubin sensitized photoinactivation of enzymes in the isolated membrane of the human erythrocyte, *Photochem Photobiol* 1976; 24: 525-527.
 - 18) Yeary RA, Wise KJ, Davis OR: Activation of hepatic microsomal glucuronyl transferase from Gunn rats by exposure to light. *Life Sci*, 1976; 17: 1887-1892.
 - 19) Pannatier A, Jenner P and Testa B: The skin as a drug metabolizing organ. *Drug Metab Rev*, 1978; 8: 319.
 - 20) Paine AJ and McLean AE: Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase by a light driven superoxide generating system in the cell culture, *Bioch Biophys Res Commun*, 1974; 58: 482-486.
 - 21) Thomas PE, Ryan LD and Wert SB: Multiple forms of rat liver cytochrome P-450, *J Biol Chem*, 1976; 251: 1385-1391.
 - 22) Sharma RN, Cameron RG, Faber E and Griffin MJ: Multiplicity of induction patterns of rat liver microsomal mono-oxygenases and other polypeptides produced by administration of various xenobiotics, *Bioch J* 1979; 182: 317-327.
 - 23) Conny AH: Pharmacological implication of microsomal enzyme induction, *Pharmacol Rev*, 1967; 19: 317-366.
 - 24) Johnson EF, Levitt DS, Eberard UM and Thorgeisson SS: Catalysis of divergent pathway of 2-AAF metabolism by multiple forms of cytochrome P-450, *Cancer Res*, 1980; 40: 445-459.
 - 25) Miller MC, Miller JA and Hartman HA: N-OH 2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat, *Cancer Res*, 1961; 21: 815-824.
 - 26) Damelle M: Possible implication of photooxidation reactions in retinal photodamage. *Photochem Photobiol* 1979; 29: 713-718.

- 27) Kostembauder HB and Sanvordeker DL: Riboflavin enhancement of bilirubin catabolism in vitro, *Experientia* 1973; 29: 282-291.
- 28) Hovi L, Hekali R and Simes MA: Evidence of riboflavin depletion in breast fed newborn and its further acceleration during treatment of hyperbilirubinemia by phototherapy, *Acta Ped Scand*, 1979; 68: 567-570.
- 29) Patel JM and Pauer SS: Riboflavin and drug metabolism in adult male and female rats, *Bioch Pharmacol*, 1974; 23: 1467-1477.
- 30) Catz CZ, Juchav MR and Yaffe SJ. Effects of iron, riboflavin and iodine deficiencies on hepatic drug metabolizing enzyme systems, *J Pharmac Exp Ther*, 1970; 174: 197-205.
- 31) 홍영숙 · 김복희 · 성낙용: 흰쥐 간조직내 Cytochrome P-450 에 의한 AAF hydroxylation 에 의한 각종 vit. B 복합체의 영향, *이화의대지* 1980; 3: 113-118.
- 32) Speck WT, Rosenkranz S and Rosenkranz HS: Further observation on the photooxidation of DNA in the presence of riboflavin, *Biochem Biophys Acta*, 1976; 435-39-44.
- 33) Santella RM, Rosenkranz HS and Speck WT: Intracellular deoxyribonucleic acid modifying activity of intermittent phototherapy, *J of Ped* 1978; 93: 106-109.
- 34) Siders EG Papageogiou GC, Charalampous SC and Vista EM: A spectrum response study on single strand DNA breaks, sister chromatid exchanges and lethality induced by phototherapy lights, *Ped Res*, 1981; 15: 1019-1023
- 35) Bradley MO and Sharkey NA: Mutagenicity and toxicity of visible fluorescent light to cultured mammalian cells, *Nature* 1977; 266: 724-726.
- 36) Gandt R, Parshad R and Ewig RAG: Fluorescent light induced DNA cross-linkage and chromatid breaks in mouse cells in culture *Proc Nati Acad Sci*, 1978; 75: 3809-3812.
- 37) Ennever JF and Speck WT: Photodynamic reaction of riboflavin and deoxyguanosine *Ped Res*, 1981; 15: 956-958.
- 38) Ennever JE and Speck WT: Short communication photochemical reaction of riboflavin: Covalent binding to DNA and to poly(dA). poly(dT), *Ped Res*, 1983; 17: 234-236.
- 39) Vecchi C, Donzelli GP, Migliorini MG and Pratesi R: New light in phototherapy *Lancet*, 1982; 11: 390.