

## Phenobarbital 투여와 성장단계가 흰쥐 간조직 Microsome 내 Monooxygenase System에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍 영 숙 · 이 진 순

= Abstract =

### The Effect of Phenobarbital on the Monooxygenase System in the Liver Microsomes of Neonatal, Immature and Adult Rats

Y.S. Hong and J.S. Lee

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

A variety of compounds including drugs, carcinogens, steroids and fatty acids are metabolized by microsomal monooxygenase system in the liver.

The effect of phenobarbital(PB) on the monooxygenase system in the liver microsomes of neonatal, immature- and adult-rats of both sexes were investigated.

In the liver microsomes of rats, the activities of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase, cytochrome  $b_5$ , NADH-cytochrome C reductase, p-nitroanisole-O-demethylase and the formation of lipid peroxide were assayed ; the following results were obtained.

1) In the liver microsomes of rats, the activities of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome C reductase were increased in PB treated rats compared to control. Among the developmental stages, the contents of hepatic microsomal cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome C reductase were highest in the female adult rat and the male immature rat.

2) The contents of hepatic microsomal cytochrome  $b_5$  and NADH-cytochrome C reductase were increased in PB treated rats compared to control. Among the developmental stages the content of hepatic microsomal cytochrome  $b_5$  was highest in the female adult rat and the male immature rat, whereas the content of hepatic microsomal NADH-cytochrome C reductase was highest in the adult rats of both sexes.

3) The formation of lipid peroxide was increased in PB treated rats compared to control. Among the developmental stages the formation of lipid peroxide was highest in the female adult rat and the male immature rat.

4) The activity of hepatic microsomal p-nitroanisole-O-demethylase was increased in PB treated rats compared to control. Among the developmental stages the activity of p-nitroanisole-O-demethylase was highest in the female adult rat and the male immature rat.

## 서 론

간조직 microsome내에는 mixed-function oxidase system 또는 monooxygenase system이라고 불리우는 중요한 산화효소군이 존재하여, 이 효소계는 스테로이드, 지방산과 같은 내인적인 화합물 뿐만 아니라 외인적 화합물인 약물, 발암물질에 대한 대사과정에서 전자전달계의 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>.

이 효소계는 기질의 성질에 따라 Hydroxylation, Oxidative dealkylation 및 N-oxidation과 같은 산화반응 그리고 peroxidation시킨다<sup>3,6)</sup>.

그러나 이러한 효소계에 의한 발암물질의 대사는 독성을 나타내기도 하고 어떤 경우는 해독작용을 하기도 한다<sup>7,8)</sup>.

그러므로 이 효소계의 효소들의 양은 생체 대사과정에서 중요 결정요인이 된다.

또한 어떤 약물들과 화합물들은 microsome내 monooxygenase system의 주요 구성성분인 cytochrome P-450의 양을 증가시키고 또한 그 oxidase activity를 촉진시키므로써 기질을 대사시키는 능력을 증가시키기도 하고<sup>9-12)</sup>, 반면 어떤 약물들은 cytochrome P-450의 기능을 억제하여 간조직내의 drug biotransfer activity를 저해하기도 한다. 특히 phenobarbital은 cytochrome P-450의 강력한 유도물질로서 여러 종류의 microsome내 hydroxylation 반응을 촉진시킨다고 알려져 있다<sup>9,13)</sup>.

또한 이 효소계는 영양소, 체내의 홀몬변화, 성별, 연령 및 개체차이에 따라 영향을 받는다<sup>14,15)</sup>. Basu 등<sup>15)</sup>은 연령에 따라 간조직 약물대사 효소의 활성이 변화된다고 보고하였다. 그리고 Kamataki 등<sup>16)</sup>은 연령에 따른 이러한 효소들의 활성 변화는 성별에 따라 다른 경향을 나타내었으며 이때 cytochrome P-450의 isoenzyme중 sex-specific isoenzyme의 함량도 함께 변화되었다고 보고하였다.

이상의 보고들은 성별과 연령 그리고 phenobarbital(이하 PB로 생략함)과 같은 유도물질 투여에 따라 cytochrome P-450 함량 및 전체 cytochrome P-450에 대한 isoenzyme의 함량이 변화되어 간조직의 약물대사에 변화를 주게 된다는 것을 시사하고 있다.

따라서 본 연구에서는 암컷과 수컷 흰쥐를 신생

(Neonatal), 미성숙(Immature), 성숙(Adult)의 세 가지 성장단계로 구분하여 성장과 성별에 따른 microsome내 monooxygenase system 효소들의 활성도를 비교하고 또한 PB를 미성숙 및 성숙한 암컷과 수컷 흰쥐에 투여한 후 이 효소계의 변화를 측정 관찰하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

실험동물은 암컷과 수컷 흰쥐(wister)를 각각 생후 5~6일의 신생쥐, 50~60g의 미성숙한 쥐, 그리고 150g 이상의 성숙한 쥐의 세 가지 실험군으로 성장 단계를 구분하였다. 또한 PB는 신생쥐를 제외한 미성숙한 쥐와 성숙한 쥐에 각각 7.5mg/100g body weight/day in saline씩 3일간 복강내로 주사하였다.

모든 실험동물들은 20~22°C의 통풍이 잘되는 방에서 시판 고형사료와 수도물로 사육하였으며 희생시키기 전 24시간 동안 금식시킨 후 참수시켜 간장을 절제하였다.

### 1. Microsome의 분리

Microsome의 분리는 Lotlikar 등(17)의 방법을 사용하였다. 흰쥐에서 절제한 간조직을 homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose용액으로 25% homogenate를 만들었다. 이를 9,000g에서 20분간 원심분리하고 다시 그 상층액을 9,000g에서 10분간 원심분리하여 침전되는 핵과 mitochondria층을 제거하였다. 이 상층액을 다시 105,000g에서 1시간동안 초원심분리기(Beckman-Model L8-80)로 원심분리하여 침전된 microsome을 분리하였고 0.25M sucrose로 1g/ml되게 균질용액을 만들었다.

### 2. 단백질 정량방법

단백질 함량측정은 Lowry 등<sup>18)</sup>의 방법으로 발색하여 700nm에서 spectrophotometer(spectronic 2, 000 Bauch and Lomb)로 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

### 3. Cytochrome P-450의 정량법

Microsomal cytochrome P-450의 함량 측정은 Omura와 Sato<sup>19)</sup>의 방법으로 reduced carbon monoxide complex를 450nm와 490nm에서 spectrophotometer(Perkin-Elmer 554)로 측정하였다. 이때 molar

extinction coefficient는  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

#### 4. Cytochrome $b_5$ 의 정량법

Microsomal cytochrome  $b_5$ 의 함량 측정은 Smuckler(3)의 방법을 사용하여 환원형과 산화형의 흡광도 차 측, 424nm와 409nm의 흡광도 차를 spectrophotometer(Perkin-elmer 554)로 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient는  $185\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

#### 5. NADPH-및 NADH-cytochrome C reductase 활성 측정방법

NADPH-cytochrome C reductase의 활성은 Omura와 Takesue<sup>20)</sup>의 방법을 사용하여 550nm에서의 흡광도 증가를 측정 계산 하였으며 이때 molar extinction coefficient는  $21.1\text{mM}^{-1}$ 로 하였다.

NADH-cytochrome C reductase의 활성도 같은 방법을 사용하였으며 단지 NADPH 대신 NADH를 사용하였다.

#### 6. Lipid peroxidation 측정

Lipid peroxidation 측정은 Buege와 Aust<sup>6)</sup>의 방법을 사용하여 반응결과 생성되는 malondialdehyde의 양을 550nm에서의 흡광도 측정으로 계산하였다.

#### 7. p-Nitroanisole-O-demethylase 측정방법

p-Nitroanisole-O-demethylase의 활성도는 Netter와 Sidel(21) 방법으로 400nm에서 optical density를 측정하였다. Molar extinction coefficient는  $14.5\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하였다.

### 실험 결과

#### A. Cytochrome P-450의 함량

##### 1. 성장단계에 따른 암컷과 수컷 흰 쥐에서의 Cytochrome P-450함량

표 1에서 보는 바와 같이 암컷 흰 쥐에서의 cytochrome P-450 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 현저히 낮았으며( $p<0.01$ ), 성숙한 쥐는 신생쥐와는 별 차이가 없었으며 미성숙한 쥐에 비해서는 현저히 높은 값을 나타내었다( $p<0.01$ ).

수컷 흰 쥐에서의 cytochrome P-450의 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 현저히 높았으며( $p<0.01$ ), 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해서는 현저히 높았

으나( $p<0.05$ ). 미성숙한 쥐에 비해서는 현저히 낮았다( $p<0.05$ ).

즉 성장단계에 따른 cytochrome P-450 함량은 암컷은 성숙한 쥐에서, 수컷은 미성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났다.

또한 암컷과 수컷의 cytochrome P-450 함량은 신생쥐에서는 암컷이 수컷에 비해 현저히 높았으나( $p<0.001$ ), 미성숙한 쥐에서는 암컷이 수컷에 비해 현저히 낮았고( $p<0.001$ ) 성숙한 쥐의 경우도 암컷이 수컷에 비해 약간 낮았다(그림 1A).

##### 2) PB 투여에 따른 cytochrome P-450의 함량변화.

표 2에서 보는 바와 같이 미성숙한 쥐의 경우 암컷이 대조군  $0.40\pm 0.05\text{nmole}$ 에 비해 암컷 PB 투여군은  $1.73\pm 0.08\text{nmole}$ 로, 수컷 대조군  $0.82\pm 0.07\text{nmole}$ 에 비해 수컷 PB 투여군은  $1.66\pm 0.14\text{nmole}$ 로 각각 유의있게 증가하였다( $p<0.001$ ).

성숙한 쥐의 경우도 암컷 대조군  $0.63\pm 0.07\text{nmole}$ 에 비해 암컷 PB 투여군은  $1.82\pm 0.09\text{nmole}$ 로, 수컷 대조군  $0.67\pm 0.06\text{nmole}$ 에 비해 수컷 PB 투여군은  $2.14\pm 0.08\text{nmole}$ 로 각각 유의있게 증가하였다( $p<0.001$ ).

#### B. NADPH-cytochrome c reductase의 함량.

##### 1. 성장단계에 따른 암컷과 수컷 흰 쥐에서의 NADPH-cytochrome C reductase 함량

표 1에서 보는 바와 같이 암컷 흰 쥐에서의 NADPH-cytochrome C reductase 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 통계학적인 의의는 없었으나 13.7% 낮았고, 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해 9.7% 높았고 미성숙한 쥐에 비해서는 현저히 높았다( $p<0.02$ ).

수컷 흰 쥐에서의 NADPH-cytochrome C reductase 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 현저히 높았으며( $p<0.05$ ), 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해 9.9% 높았으나 미성숙한 쥐에 비해서는 38.1% 낮았다.

즉 성장단계에 따른 NADPH-cytochrome C reductase 함량은 암컷은 성숙한 쥐에서, 수컷은 미성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났다.

또한 암컷과 수컷은 NADPH-cytochrome C reductase 함량은 신생쥐와 성숙한 쥐에서는 암컷이 수컷에 비해 약간 낮았으며 미성숙한 쥐에서는 암컷이 수컷에 비해 현저히 낮았다( $p<0.001$ ), (그림 1B).

Table 1. Effects of developmental stages and sex on the monooxygenase system : the activities of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase, cytochrome b<sub>5</sub>, NADH-cytochrome C reductase, p-nitroanisole-O-demethylase and the formation of lipid peroxide.

Measurement	Female			Male		
	Neonatal	Immature	Adult	Neonatal	Immature	Adult
Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	0.62 ± 0.02	0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.04	0.82 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>d</sup>
NADPH-cytochrome C reductase (nmoles/mg protein/min)	26.92 ± 3.35	23.23 ± 1.42	29.51 ± 2.43 <sup>c</sup>	29.99 ± 5.51	46.69 ± 10.81 <sup>b</sup>	30.77 ± 4.08
Cytochrome b <sub>5</sub> (nmoles/mg protein)	0.64 ± 0.10	0.42 ± 0.20	0.84 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.20	0.95 ± 0.25	0.83 ± 0.13 <sup>b</sup>
NADH-cytochrome c reductase (nmoles/mg protein/min)	128.34 ± 16.23	125.92 ± 5.69	508.78 ± 14.27 <sup>a</sup>	144.37 ± 32.06	172.95 ± 6.82	294.51 ± 10.31 <sup>b</sup>
Lipid peroxide (nmoles/mg protein/min)	1.43 ± 0.11	1.85 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.34 <sup>a*</sup>	1.57 ± 0.20	2.21 ± 0.13 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.11 <sup>b</sup>
P-Nitroanisole-O-demethylase (nmoles/mg protein/min)	2.34 ± 0.56	1.52 ± 0.28	2.40 ± 0.48	2.74 ± 0.46	2.84 ± 0.22	2.28 ± 0.42

Each Value represents mean ± S.D.

a. Significantly different from neonatal female value p < 0.02.

a'. Significantly different from neonatal female value p < 0.001.

b. Significantly different from neonatal female value p < 0.001.

b'. Significantly different from neonatal male value p < 0.01.

c. Significantly different from immature female value p < 0.002.

c'. Significantly different from immature female value p < 0.01.

d. Significantly different from immature female value p < 0.05.

b. Significantly different from neonatal male value p < 0.01

b'. Significantly different from neonatal male value p < 0.001

c. Significantly different from immature female value p < 0.002

c'. Significantly different from immature female value p < 0.01

d. Significantly different from immature female value p < 0.05

2. PB 투여에 따른 NADPH-cytochrome P-450의 함량 변화

표 2에서 보는 바와 같이 미성숙한 쥐의 경우 암컷 대조군  $23.23 \pm 1.42$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은

$82.51 \pm 1.97$  nmoles로, 숫컷 대조군  $46.69 \pm 10.81$  nmoles에 비해 숫컷 PB 투여군은  $106.63 \pm 4.07$  nmoles로 각각 유의있게 증가하였다.

성숙한 쥐의 경우도 암컷 대조군  $29.51 \pm 2.43$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $97.72 \pm 2.45$  nmoles로,

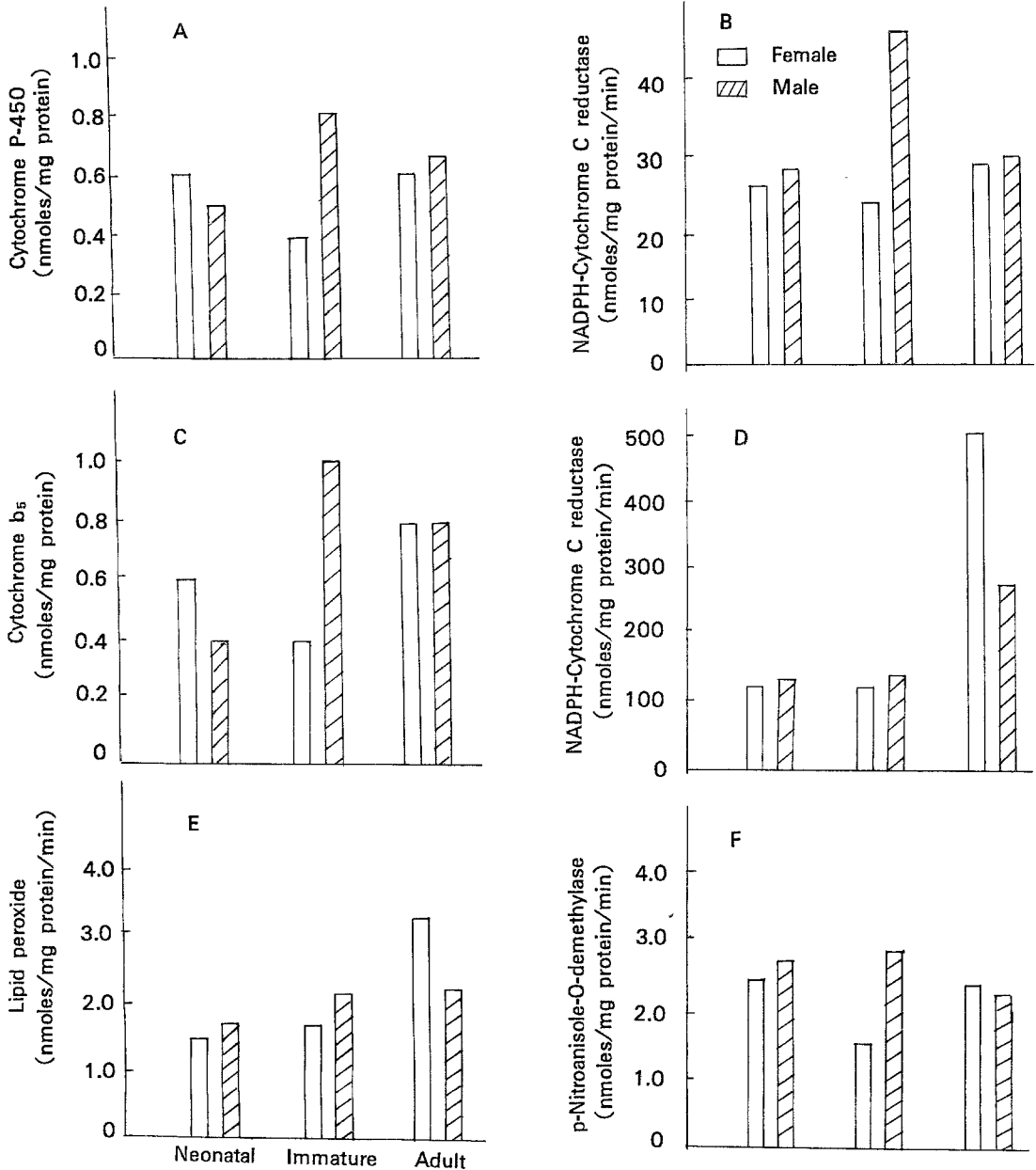


Fig. 1. Effects of developmental stages and sex on the monooxygenase system ; the activities of cytochrome P-450 (A), NADPH-cytochrome C reductase (B), cytochrome b<sub>5</sub> (C), NADH-cytochrome C reductase (D), p-nitroanisole-O-demethylase (F), and formation of lipid peroxide (E), The results are given as mean  $\pm$  S.D.

Table 2. Effect of phenobarbital on the monooxygenase system : the activities of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase, cytochrome b<sub>5</sub>, NADH-cytochrome C reductase, p-nitroanisole-O-demethylase and the formation of lipid peroxide.

Measurement		Female		Male	
		Immature	Adult	Immature	Adult
Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	control	0.40 ± 0.05	0.63 ± 0.07	0.82 ± 0.07	0.66 ± 0.06
	PB treated	1.73 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.09	1.66 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.08 <sup>a</sup>
NADPH-cytochrome C reductase (nmoles/mg protein/min)	control	23.23 ± 1.42	29.51 ± 2.43	46.69 ± 10.81	30.77 ± 4.08
	PB treated	82.51 ± 1.97 <sup>a</sup>	07.72 ± 2.45 <sup>a</sup>	106.63 ± 4.07 <sup>a</sup>	100.40 ± 3.97 <sup>a</sup>
Cytochrome b <sub>5</sub> (nmoles/mg protein)	control	0.42 ± 0.18	0.84 ± 0.21	0.95 ± 0.03	0.83 ± 0.13
	PB treated	0.95 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.19	1.56 ± 0.32 <sup>b</sup>
NADPH-cytochrome C reductase (nmoles/mg protein/min)	control	125.92 ± 5.69	508.78 ± 14.27	172.95 ± 6.82	294.51 ± 10.31
	PB treated	376.35 ± 18.50 <sup>a</sup>	329.80 ± 2.45 <sup>a</sup>	222.41 ± 14.42 <sup>c</sup>	274.78 ± 17.26
Lipid peroxide (nmoles/mg protein/min)	control	1.85 ± 0.01	3.15 ± 0.34	2.21 ± 0.13	2.24 ± 0.11
	PB treated	2.72 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.12 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.30 <sup>b</sup>
p-Nitroanisole-O-demethylase (nmoles/mg protein/min)	control	1.52 ± 0.28	2.40 ± 0.48	2.84 ± 0.22	2.28 ± 0.42
	PB treated	5.86 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.70 ± 0.58 <sup>a</sup>	6.40 ± 0.52 <sup>a</sup>	6.48 ± 0.36 <sup>a</sup>

Each value represents mean ± S.D.

a. Significantly different from control p < 0.02.

b. Significantly different from control p < 0.01.

c. Significantly different from control p < 0.001.

숫컷 대조군  $30.77 \pm 4.08$  nmoles에 비해 숫컷 PB 투여군은  $100.40 \pm 3.97$  nmoles로 각각 유의있게 증가하였다( $p < 0.001$ ).

### C. Cytochrome b<sub>5</sub>의 함량

#### 1. 성장단계에 따른 암컷과 숫컷 흰쥐에서의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량

표 1에서 보는 바와 같이 암컷 흰쥐에서의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 통계학적인 의의는 없으나 34.5% 낮았고, 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해서는 31.3% 정도 높았으며 미성숙한 쥐에 비해서는 현저히 높았다( $p < 0.002$ ).

숫컷 흰쥐에서의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 통계학적인 의의는 없으나 34.5% 낮았고, 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해서는 31.3% 정도 높았으며 미성숙한 쥐에 비해서는 현저히 높았다( $p < 0.02$ ).

숫컷 흰쥐에서의 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 통계학적인 의의는 없었으나 2~3배 높았고, 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해서는 현저히 높았지만( $p < 0.05$ ) 미성숙한 쥐에 비해서는 12.6% 낮았다.

즉 성장단계에 따른 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 암컷은

성숙한 쥐에서, 숫컷은 미성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났다.

또한 암컷은 숫컷과 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 신생쥐에서는 암컷이 숫컷에 비해 35.9% 높았으며, 미성숙한 쥐에서는 암컷이 숫컷에 비해 유의있게 낮았고( $p < 0.02$ ), 성숙한 쥐에서는 암컷과 숫컷이 별 차이가 없었다(그림 1C).

#### 2. PB 투여에 따른 cytochrome b<sub>5</sub>의 함량 변화

표 2에서 보는 바와 같이 미성숙한 쥐의 경우 암컷 PB 투여군은  $0.95 \pm 0.03$  nmoles로 유의있게 증가하였으며( $p < 0.001$ ), 숫컷 PB 투여군은  $1.24 \pm 0.19$  nmoles로 숫컷 대조군  $0.95 \pm 0.25$  nmoles에 비해 30.5% 증가하였다. 성숙한 쥐의 경우 암컷 대조군  $0.84 \pm 0.21$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $1.83 \pm 0.07$  nmoles로 유의있게 증가하였으며( $p < 0.001$ ), 숫컷 PB 투여군  $1.56 \pm 0.32$  nmoles도 숫컷 대조군  $0.83 \pm 0.13$  nmoles에 비해 유의있게 증가하였다( $p < 0.002$ ).

### D. NADH-Cytochrome C reductase의 함량

#### 1. 성장단계에 따른 암컷과 숫컷 흰쥐에서의 NADH-cytochrome C reductase 함량

표 1에서 보는 바와 같이 암컷 흰쥐에서의 NADH-

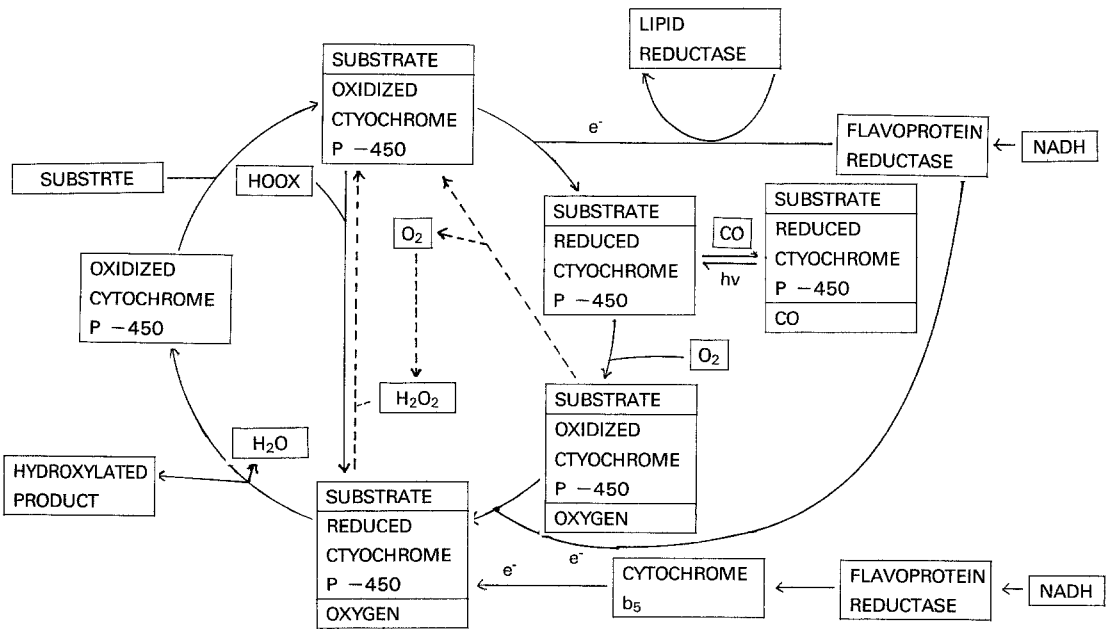


Fig. 2. Reaction mechanism of the cytochrome P-450 dependent microsomal mixed-function oxidase system<sup>2)</sup>.

cytochrome C reductase 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐와 거의 같았고, 성숙한 쥐는 신생쥐나 미성숙 쥐에 비해 현저히 높았다( $p < 0.001$ ).

숫컷 흰쥐에서의 NADH-cytochrome C reductase 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 19.8% 정도 높았고, 성숙한 쥐는 신생쥐에 비해 19.8% 정도 높았고, 성숙한 쥐는 신생쥐나 미성숙한 쥐에 비해 모두 현저히 높았다( $p < 0.01$ ).

즉 성장단계에 따른 NADH-cytochrome C reductase 함량은 암컷과 숫컷의 경우 모두 성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났다.

또한 암컷과 숫컷의 NADH-cytochrome C reductase 함량은 암컷이 숫컷에 비해 신생쥐에서는 10.8% 낮았고 미성숙한 쥐에서는 현저히 낮았으며( $p < 0.01$ ), 성숙한 쥐에서는 암컷이 숫컷에 비해 현저히 높았다( $p < 0.001$ ), (그림 1D).

## 2. PB 투여에 따른 NADH-cytochrome C reductase의 함량 변화

표 2에서 보는 바와 같이 미성숙한 쥐의 경우 암컷 대조군  $125.92 \pm 5.69$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $376.35 \pm 18.50$  nmoles로 의미있게 증가하였으며( $p < 0.001$ ), 숫컷 PB 투여군도  $222.41 \pm 14.42$  nmoles로 숫컷 대조군  $172.95 \pm 6.82$  nmoles에 비해 의미있게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그러나 성숙한 쥐의 경우 암컷 대조군  $508.78 \pm 14.27$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $329.80 \pm 2.45$  nmoles로 오히려 의미있게 감소하였으나( $p < 0.001$ ), 숫컷 PB 투여군도  $274.78 \pm 17.26$  nmoles로 숫컷 대조군  $294.51 \pm 10.31$  nmoles에 비해 6.7% 감소하였다.

## E. Lipid peroxidation

### 1. 성장단계에 따른 암컷과 숫컷 흰쥐에서의 lipid peroxidation

표 1에서 보는 바와 같이 암컷 흰쥐에서의 lipid peroxidation 결과 생성된 malondialdehyde의 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 높았으며( $p < 0.01$ ), 성숙한 쥐는 신생쥐나 미성숙한 쥐에 비해 현저히 높았다(각각  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ).

숫컷 흰쥐에서의 malondialdehyde 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 현저히 높았으며( $p < 0.01$ ),

성숙한 쥐는 신생쥐에 비해서는 현저히 높았으나( $p < 0.01$ ) 미성숙한 쥐와는 별 차이가 없었다.

즉 성장단계에 따른 lipid peroxide 형성은 암컷은 성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났고, 숫컷은 미성숙한 쥐와 성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났다.

또한 암컷과 숫컷의 lipid peroxide 형성은 신생쥐와 미성숙한 쥐에서는 숫컷이 암컷에 비해 높았고 성숙한 쥐에서는 암컷이 숫컷에 비해 높았다(그림 1E).

### 2. PB 투여에 따른 lipid peroxidation 변화

표 2에서 보는 바와 같이 미성숙한 쥐의 경우 암컷 대조군  $1.85 \pm 0.01$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $2.72 \pm 0.07$  nmoles로, 숫컷 대조군  $2.21 \pm 0.13$  nmoles에 비해 숫컷 PB 투여군은  $3.12 \pm 0.10$  nmoles로 모두 의미있게 증가하였다( $p < 0.001$ ).

성숙한 쥐의 경우는 암컷 대조군  $3.15 \pm 0.34$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $2.46 \pm 0.03$  nmoles로 오히려 의미있게 감소하였으며( $p < 0.02$ ), 숫컷 PB 투여군은  $2.49 \pm 0.30$  nmoles로 숫컷 대조군  $2.24 \pm 0.11$  nmoles에 비해 10.9% 증가하였다.

## F. p-Nitroanisole-O-demethylase 함량

### 1. 성장단계에 따른 암컷과 숫컷 흰쥐에서의 p-nitroanisole-O-demethylase 함량

표 1에서 보는 바와 같이 암컷 흰쥐에서의 p-nitroanisole-O-demethylase 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐에 비해 35.0% 낮았고, 성숙한 쥐는 신생쥐와 비슷한 값을 나타내었으며 미성숙한 쥐에 비해 통계적인 의미는 없으나 57.9% 높았다.

숫컷 흰쥐에서의 p-nitroanisole-O-demethylase 함량은 미성숙한 쥐가 신생쥐와 거의 비슷한 값을 나타내었고, 성숙한 쥐는 신생쥐나 미성숙한 쥐에 비해 약간 낮았다.

즉 성장단계에 따른 p-nitroanisole-O-demethylase 함량은 암컷은 성숙한 쥐에서, 숫컷은 미성숙한 쥐에서 높은 값이 나타났다.

또한 암컷과 숫컷은 p-nitroanisole-O-demethylase 함량은 신생쥐와 성숙한 쥐에서는 암컷과 숫컷이 별 차이가 없었으며, 미성숙한 쥐에서는 암컷이 숫컷에 비해 의미있게 낮았다( $p < 0.001$ ), (그림 1F).



## 2. PB 투여에 따른 p-nitroanisole-O-demethylase의 활성 변화

표 2에서 보는 바와 같이 미성숙한 쥐의 경우 암컷 대조군  $1.52 \pm 0.28$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $5.86 \pm 0.24$  nmoles로, 수컷 대조군  $2.84 \pm 0.22$  nmoles에 비해 수컷 PB 투여군은  $6.40 \pm 0.52$  nmoles로 각각 의의있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 성숙한 쥐의 경우도 암컷 대조군  $2.40 \pm 0.48$  nmoles에 비해 암컷 PB 투여군은  $5.78 \pm 0.58$  nmoles로, 수컷 대조군  $2.28 \pm 0.42$  nmoles에 비해 수컷 PB 투여군은  $6.48 \pm 0.36$  nmoles로 각각의 의의있게 증가하였다( $p < 0.001$ ).

## 고 찰

간조직내 microsome에는 2종류의 전자전달계가 존재한다. 하나는 NAPH-dependent system으로 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase 및 phosphatidyl choline으로 구성되어 있으며 다른 하나는 NADH-dependent system으로 cytochrome  $b_5$ , NADH-cytochrome C reductase 및 cyanide-sensitive factor로 구성되어 있다. 그러나 대부분의 monooxygenase 반응들은 cytochrome P-450 과 NADPH-cytochrome C reductase를 포함하고 있는 NADPH-dependent system에서 일어난다. 일반적으로 인정된 microsome의 mixed-function oxidase system 즉, monooxygenase system의 각 단계들은 그림 2에 요약되어 있다.

어떤 약물이나 화학물질들은 cytochrome P-450 함량이나 그의 다른 monooxygenase system의 효소 활성을 증가시켜 기질의 신진대사를 증가시킨다는 것이 입증되었다<sup>13)22)</sup>.

본 실험에서 PB를 투여한 군의 cytochrome P-450 및 NADPH-cytochrome C reductase의 함량은 대조군에 비해 모두 2~3배 증가되었다. 이와같이 PB는 현저한 cytochrome P-450의 유도물질임을 알 수 있었다.

한편 PB를 투여한 군에서 cytochrome  $b_5$ 의 함량도 약 2배 증가하였는데 NADH-cytochrome C reductase의 함량은 다소 일관성이 없는 변화를 나타내었다.

Lipid peroxidation은 polyunsaturated fatty acid

에서 수소 원자를 제거하여 lipid radical을 형성하는 산화적 분해과정으로 많은 xenobiotics의 독성, aging과 같은 정상적인 생리상태에서도 일어난다. 또한 microsomal membrane 구조의 변화뿐 아니라 microsomal enzyme의 활성을 감소시키며 세포의 구조적, 기능적 손상을 초래한다.

Microsomal cytochrome P-450은 산소의 흡수력과 lipid peroxide의 생성을 촉진시키기 위해 exogenous lipid hydroperoxide와 상호 작용한다<sup>22)23)</sup>. 이것은 lipid peroxidation이 cytochrome P-450과 밀접한 관계가 있음을 시사하는 것이다. 본 실험에서도 cytochrome P-450의 유도물질인 PB를 투여한 군에서 lipid peroxidation이 대조군에 비해 증가되었다.

이밖에 monooxygenase system은 약물이나 많은 유기화합물의 dealkylation에도 관여한다고 보고되었으<sup>21,24)</sup> Netter와 Sidel<sup>21)</sup>은 microsome내 p-nitroanisole-O-demethylation이 PB와 그의 다른 약물에 의해 자극된다고 보고하였다. 본 실험에서 PB를 투여한 군에서 p-nitroanisole-O-demethylase의 활성이 대조군에 비해 2~3배 증가되었으며 또한 이들 PB 투여군에서 microsomal cytochrome P-450의 함량이 현저히 유도된 것으로 보아 p-nitroanisole-O-demethylation과 cytochrome P-450과는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

Cytochrome P-450은 유도물질, 개체, 조직 및 성별에 따라 여러 multiple form이 존재하며<sup>14)16)26)27)</sup>, 또한 PB와 같은 유도물질의 투여와 성별 및 성장 단계에 따라 간조직 약물대사 능력은 cytochrome P-450의 함량과 같은 경향으로 변화된다고 보고되었다<sup>16)19)</sup>. 이상의 보고들에서는 유도물질 뿐만 아니라 성별 및 연령에 따른 cytochrome P-450의 함량 및 약물대사 효소계의 변화가 cytochrome P-450의 isoenzyme들과 관련이 있음을 시사하고 있다.

여러 보고들에서 PB에 의한 cytochrome P-450의 함량 증가는 이러한 cytochrome P-450의 함량 증가는 이러한 cytochrome P-450의 여러 isoenzyme중 특히 PB에 의해 specific하게 증가되는 isoenzyme의 증가에 의한 것임을 알 수 있다<sup>28)29)</sup>.

Basu 등<sup>15)</sup>은 수컷 흰쥐에서 간조직 약물대사 효소들의 활성은 출생 직후에는 비교적 낮으며 일정기간 성숙할 때까지 높아지다가 그후 다시 낮아진다고 보고되었다. 본 실험에서도 수컷 흰쥐에서의 성장

단계에 따른 cytochrome P-450 및 monooxygenase system 효소들의 함량 변화는 Basu 등의 보고와 같은 경향을 나타냈다.

Kamatani 등<sup>16)</sup>은 간조직 microsome에서 sex-specific한 cytochrome P-450 isoenzyme을 분리하여 male-specific form은 P-450-male, female-specific form은 P-450-female로 각각 보고하였다. 또한 그는 성별 및 성장단계에 따른 간조직내 약물대사 효소의 활성과 이 두 isoenzyme의 함량이 같은 경향으로 변화되었으며 이러한 경향은 암컷과 수컷의 경우 서로 다르게 나타났다고 보고하였다. 이와같은 sex-specific isoenzyme의 합성은 생체내 hormone에 의해 조절되는데 즉, P-450-male은 testosterone에 의해, P-450-female은 estrodiol에 의해 조절되므로 성장단계에 따른 생체내 hormone의 변화는 이러한 sex-specific isoenzyme의 함량 변화를 초래한다.<sup>29)30)</sup>

그러므로 성장단계에 따른 약물대사나 monooxygenase system 효소들의 활성 변화는 성장단계에 따라 생체내 hormone의 함량이 변화되면 이에 따라 sex-specific isoenzyme의 함량이 함께 변화되어 나타나는 것이라고 부분적으로나마 설명할 수 있다. 또한 성장단계에 따른 hormone의 변화는 성별에 따라 다른 경향을 나타내므로 monooxygenase system 효소들의 활성 변화도 성별에 따라 다르게 나타난다고 생각된다.

본 연구에서는 phenobarbital이 강력한 cytochrome P-450의 유도물질이며 monooxygenase system의 반응을 촉진시킨다는 것을 확인하였다. 그리고 이 효소계 효소들의 활성은 성별 및 성장단계에 따라 서로 다른 경향으로 변화되었는데 암컷 흰쥐의 경우 성숙한 쥐에서, 수컷 흰쥐의 경우 미성숙한 쥐에서 효소들의 활성이 전반적으로 높게 나타났다.

## 결 론

Phenobarbital 투여와 신생, 미성숙 및 성숙의 세 성장단계에 따른 간조직 microsome내 monooxygenase system 효소들의 함량 변화에 대한 결론은 다음과 같다.

1) 성장단계에 따른 cytochrome P-450 함량은 암컷의 경우 신생쥐에서, 수컷의 경우 미성숙한 쥐에서 높았다.

그리고 암컷과 수컷의 미성숙 및 성숙 PB 투여군은 cytochrome P-450 함량이 각 대조군에 비해 2~3배 증가하였다.

2) 성장단계에 따른 NADPH-cytochrome C reductase의 함량은 암컷의 경우 성숙한 쥐에서, 수컷의 경우 미성숙한 쥐에서 가장 높았다.

그리고 암컷과 수컷의 미성숙 및 성숙 PB 투여군은 cytochrome b<sub>5</sub>의 함량이 각 대조군에 비해 약 2배 증가하였다.

4) 성장단계에 따른 NADH-cytochrome C reductase 함량은 암컷과 수컷의 경우 모두 성숙한 쥐에서 가장 높았다.

그리고 암컷과 수컷의 미성숙 PB 투여군은 NADH-cytochrome C reductase 함량 각 대조군에 비해 증가하였으나 암컷의 성숙 PB 투여군은 대조군에 비해 약 2배 감소하였고 수컷의 성숙 PB 투여군은 6.7% 감소되었다.

5) 성장단계에 따른 lipid peroxide의 형성은 암컷의 경우 성숙한 쥐에서, 수컷의 경우 성숙한 쥐와 미성숙한 쥐에서 높았다.

그리고 암컷과 수컷의 미성숙 PB 투여군은 lipid peroxide 형성이 각 대조군에 비해 약 2배 증가되었으나, 수컷의 성숙 PB 투여군은 대조군에 비해 별 차이가 없었으며 암컷의 성숙 PB 투여군은 대조군에 비해 감소하였다.

6) 성장단계에 따른 p-nitroanisole-O-demethylase 함량은 암컷의 경우 성숙한 쥐에서, 수컷의 경우 미성숙한 쥐에서 가장 높았다.

그리고 암컷과 수컷의 미성숙 및 성숙 PB 투여군은 p-nitroanisole-O-demethylase 함량이 각 대조군에 비해 2~4배 증가하였다.

## References

- 1) Gillette JR : *Factors affecting drug metabolism. Ann NY Acad Sciz* 1971 ; 179 : 43
- 2) Ernest H and Guthrie EF : *Introduction to biochemical toxicology. 2nd Ed* : 72 New York Elsevier 1982 ;
- 3) Smuckler EA, Arrhenius E and Hulton T : *Alterations of microsomal electron transport, oxidative N-demethylation and azo-dye cleavage in carbon*

- tetrachloride and demethylnitroamine-induced liver injury. Biochem. J* 1967 ; 103 : 55
- 4) Anthony YH, Lu Junk KW and Coon MJ : *Resolution of the cytochrome P-450 containing w-hydroxylation system of liver microsomes into three components. J Biol Chem* 1969 ; 244 : 3714
  - 5) Aoyama Y, Okikawa T and Yoshida : *Evidence for the presence of cytochrome P-450 functional in lanosterol 14- demethylation in microsomes of aerobically grown respiring yeast. Biochim Biophys Acta* 1982 ; 665 : 596
  - 6) Buege JA and Aust SD : *Microsomal lipid peroxidation. Method Enzymolgy* 1978 ; 52 : 302
  - 7) Miller JA : *Carcinogenesis by chemicals. Cancer Res* 1970 ; 30 : 559
  - 8) Gillette JR, Davis DC and Sasame HA : *Cytochrome P-450 and its role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol* 1972 ; 12 : 57
  - 9) Conney JA : *Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol. Rev* 1967 ; 19 : 317
  - 10) Miller ON : *Nutrition and drug metabolism. Fed Proc* 1976 ; 35 : 2459
  - 11) Tonda K, Hasegawa T and Hirata M : *Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatments on monooxygenase activities and proportions of isolated rat hepatocyte subpopulations. Mol Pharmacol* 1982 ; 23 : 235
  - 12) Conney AH and Gilman AG : *Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. J Biol Chem* 1963 ; 238 : 3682
  - 13) Lu ATH, Kuntzman R, West S, Jacobson M and Conney AH : *Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrates. J Biol Chem* 1972 ; 247 : 1727
  - 14) John YL, Anthony C, Dilella G and Steggles AW : *Effects of inducers and aging on rabbit liver microsomal drug-metabolizing enzymes. Mol Pharmacol* 1982 ; 23 : 244
  - 15) Basu TK, Dickerson JWT and Parke DV : *The effect of development on the activity of drug metabolizing enzymes in the liver of the rat. Biochem J* 1970 ; 119 : 54
  - 16) Kamtaki T, Maeda K, Shimada M, Kitani K, Nagai T and Kato R : *Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. J Pharmacol & Exp Therp* 1985 ; 233 : 222
  - 17) 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
  - 18) Lowry OH, Rosebroung NJ, Farr AL and Randall RT : *Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 ; 193 : 265
  - 19) Omura T and Sato R : *Carbon monoxide binding pigment of liver microsomes II. solubilization, purification and properties. J Biol Chem* 1964 ; 239 : 2370
  - 20) Omura T, and Takesue S : *A new method for simultaneous purification of cytochrome b<sub>5</sub> and NADPH-cytochrome C reductase from rat liver microsomes. J Biochem* 1970 ; 67 : 249
  - 21) Netter KJ and Seidel G : *An adaptively stimulated O-methylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. J Pharmacol Exp Therp* 1961 ; 196 : 146
  - 22) Lu ATH, Kuntzman R, West S, Jacobson M and Conney AH : *Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs*
  - 23) O'Brien PJ, Rahimtula A : *Involvement of cytochrome P-450 in the intracellular formation of lipid peroxide. J Agric Food Chem* 1975 ; 23(2) : 154
  - 24) Ortized PR and Mico BA : *Destruction of cytochrome P-450 by ethylene and other olefins. Mol Pharmacol* 1980 ; 18 : 128
  - 25) Peterson FJ, Holloway DE, Duguet PH and Rivers JM : *Dietary ascorbic acid and hepatic mixed function oxidase activity in the guinea pig. Biochem Pharma* 1983 ; 32 : 91
  - 26) Waxman DJ, Dannan GA and Guengerich FP : *Regulation of rat hepatic cytochrome P-450 : age-dependent expression, hormonal imprinting and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzyme. Biochemistry* 1985 ; 24 : 4409

- 27) Peterson FJ and Holzman JL : *Drug metabolism in the liver -a perspective, in extra hepatic metabolism of drugs and other foreign compounds* (TE Gram, ed). *Specialty Medical and Scientific Book, New York, 1980 ; 1*
- 28) Schmucker DL and Wang RK : *Effects of aging and phenobarbital on the rat liver microsomal drug metabolizing system. Mech Ageing Dev 1981 ; 15 : 189*
- 29) Ryan DE, Thomas PE, Korzeniowski D and Liovin W : *Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with PCB, PB, and 3-MC. J Biol Chem 1980 ; 254 : 1365*
- 30) Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T and Kato R : *Sex difference of cytochrome P-450 in the rat : purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. Arch Biochem Biophys 1983 ; 225 : 758*