梨花醫大誌 : 第 8 卷 • 第 1 號 • 1985
Ewha Med. J. Vol. 8, No. 1, 1985

Vitamin A와 α-tocopherol 투여가 어린 흰쥐 간조직내 2-acetylaminofluorene Hydroxylation에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍영숙 • 송태숙 • 성낙응

= ABSTRACT =

The Effect of Vitamin A and α-Tocopherol on Hydroxylation of AAF in the Young Rat Liver Microsome

Hong Young Sook, Song Tae Suk, Sung Nak Eung.

Department of Biochemistry, college of Medicine, Ewha Womans University

The principal role of cytochrome p-450 in mixed function oxidase reactions includes hydroxylation of various drugs, fatty acids, steroids, pesticides, and carcinogens.

The effects of AAF, β-NF with vitamin A, and α-tocopherol on hepatic microsomal cytochrome p-450 content in young rats were investigated,

The result is as follows ;

1) The administrations of AAF, β-NF increased contents of hepatic microsomal cytochrome p-450.

2) The increased amount of hepatic microsomal cytochrome p-450 induced by AAF declined when vitamin A, α-tocopherol and β-NF were given.

3) AAF-ring-hydroxylation decreased in AAF group, but N-hydroxylation increased, compared to control group.

4) The administration of β-NF or β-NF and AAF increased both ring-hydroxylation and N-hydroxylation.

5) AAF-ring-hydroxylation increased when AAF was administered with vitamin A, α-tocopherol, and β-NF compared to AAF group.

논 문 개 요

Cytochrome P-450을 구성 성분으로 하는 oxidase는 hepatic microsomal mixed function oxidase system의 terminal oxidase로 많은 물질대사에 중요한역할을 한다. 이 효소계는 스테로이드, 지방산과 같은 내인적인 화합물 뿐만 아니라 외인적 화합물인 약물, 살충제 및 발암물질의 hydroxylation을 일으키므로 해독된다.

본 실험에서는 체중 50g 내외의 웅성흰쥐를 사용하여 AAF, β-NF를 각각 투여한 군, AAF와 동시에 40 I.U. 및 2000 I.U. vitamin A를 투여한 군, 또 AAF와 동시에 0.12 I.U. 및 12 I.U. α-tocopherol을 투여한 군에서 간조직 microsome내 cytochrome P-450의 함량과 cytochrome b_5의 함량을 측정하였고 간조직 microsome내 효소에 의한 AAF의 hydroxylation과정을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) AAF 및 β-NF를 투여하였을때 hepatic microsomal cytochrome P-450의 함량이 대조군에 비하여 증가하였고, cytochrome b_5의 함량은 대조군에 비하여 감소하였다.

2) Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF를 AAF와 동시에 투여하였을때 hepatic microsomal cytochrome P-450과 cytochrome b_5의 함량은 AAF에 의한 증가량만큼 감소하였다.

3) AAF를 투여하였을때 대조군에 비하여 ring-hydroxylation은 감소하였으며, N-hydroxylation은 증가하였다.

4) β-NF를 투여하였을때 또 β-NF와 AAF를 동시에 투여하였을때 대조군에 비하여 ring-hydroxylation과 N-hydroxylation과정 모두 증가하였다.

5) Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF를 AAF와 동시에 투여하였을때 AAF를 투여한 군에 비하여 ring-hydroxylation은 증가하였으며, N-hydroxylation은 감소하였다.

서 론

간조직 microsome내에는 mixed function oxidase 또는 monooxygenase라 불리우는 중요한 산화 효소군이 존재하며 많은 물질의 대사 과정에서 전자전달계로 작용하며 cytochrome P-450이라는 중요한 구성성분이 함유되어 있다[1)-3)]. 각종 간질환이 있을때는 이 효소계의 활성이 저하되고 각종 약물, 스테로이드 화합물, 지방산 및 발암물질등에 대한 대사장애를 동반하

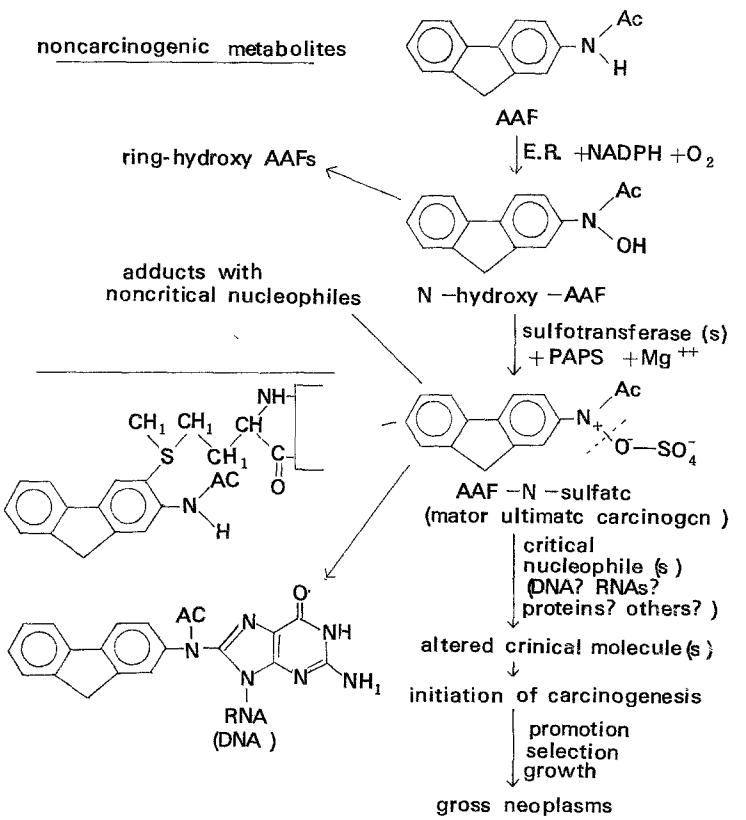

Fig. 1. Activation of 2-acetylaminofluorene Source : Heidelberger (1975).

게 된다[4].

강력한 간암물질인 AAF는 흰쥐, 생쥐, hamster 및 가토등의 동물에서 간암을 일으키는 물질이라는 것이 밝혀져 왔다. 이 AAF는 cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase system에 의하여 활성화 단계인 N-hydroxylation과 비활성 과정인 ring-hydroxylation으로 대사 되어진다(Fig. 1)[5)7)].

Vitamin A는 위장관과 호흡기에서 항암작용이 있음을 보고된 바 있다[9)-11)]. 또한 화학물질에 의하여 유도된 피부 담낭 및 대장종양에 대하여도 항암작용이 있다고 보고하였다[12)-17)]. 또한 vitamin A 결핍식이로사육한 동물에서 화학물질에 의한 발암현상에 대한 감수성과 폐암이 증가하다고 하였다[18)-19)].

Slaga 와 Brachen[20]은 α-tocopherol이 생쥐에서 polycyclic aromatic hydrocarbon에 의하여 유도된 skin tumorigenesis에 효과적인 저해제임을 보고한 바 있다. 이에 반하여 β-NF는 hepatic microsomal drug metabolism과 cytochrome P-450 함량의 증가를 유발한다고 보고하였다[21].

본 실험은 항암작용이 있다고 알려진 vitamin A 및 α-tocopherol 그리고 이들과는 반대로 drug metabolism을 증가시키는 β-NF를 투여한 후 cytochrome P-450과 cytochrome b_5의 함량변화를 측정하고 강력한 발암물질인 AAF를 동시에 투여하였을때 이들효소의 변화를 비교 관찰하였다.

또한 in vitro로 이들 효소에 의한 AAF의 활성화 과정과 비활성 과정에 대한 vitamin A와 α-tocopherol 및 β-NF와 AAF의 동시 투여에 의한 영향을 관찰하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

A. 실험재료

1) 실험에 사용한 기구

(1) Potter Elvehjem homogenizer

(2) High speed refrigerator centrifuge; Damon/Model ice B-20 A.

(3) Ultra centrifuge: Beckman/Model L_8-80.

(4) Spectrophotometer; Perkin-Elmer 554 UV-VIS Spectrophotometer.

(5) Liquid scintillation counter: Packard Tri-CA RB 300 CD.

2) 실험에 사용한 시약

(1) Vitamin A, α-tocopherol; Merck Co.

(2) β-Naphthoflavone; Aldrich chemical company Inc.

(3) [9-^{14}C]AAF (specific activity 40 μCi/n mols); New England Nuclear Corp.

(4) NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); Boehringer Mannheim Biochemicals.

(5) 이외의 시약은 reagent grade를 사용하였다.

B. 실험동물 및 실험군

1) 실험동물

체중 50g 내외의 웅성흰쥐 (Wistar strain)를사용하였으며 각 실험군은 5마리씩 배당하였다.

2) 실험군

제 1 실험군 : 대조군으로 체중 100g 당 0.5ml/day 의 corn oil을 4주간 투여하였다.

제 2 실험군 : 제 1 실험군과 같이 처치하면서 AAF (0.2 μCi/100g in ethanol)를 동물을 희생시키기 2시간 전에 복강내로 주사하였다.

제 3 실험군 : 제 1 실험군과 같이 처치하면서 β-NF (8mg/100g in corn oil)를 동물을 희생시키기 48시간 전에 복강내로 주사하였다.

제 4 실험군 : 제 1 실험군과 같이 처치하면서 β-NF (8mg/100g in corn oil)를 동물을 희생시키기 48시간 전에 복강내로 주사한 후, AAF (0.2 μCi/100g in ethanol)를 동물을 희생시키기 2시간전에 복강내로 주사하였다.

제 5 실험군 : vitamin A (40 I.U./100g/day in corn oil)를 4주간 투여 하면서 AAF (0.2 μCi/100g in ethanol)를 동물을 희생시키기 2시간 전에 복강내로 주사하였다.

제 6 실험군 : vitamin A (2000 I.U./100g/day in corn oil)를 4주간 투여하면서 AAF (0.2 μCi/100g in ethanol)를 동물을 희생시키기 2시간 전에 복강내로 주사하였다.

제 7 실험군 : α-tocopherol (0.12 I.U./100g/day in corn oil)을 4주간 투여 하면서 AAF (0.2 μCi/100g in ethanol)를 동물을 희생시키기 2시간 전에 복강내로 주사하였다.

제 8 실험군 : α-tocopherol (12 I.U./100g/day in corn oil)을 4주간 투여하면서 AAF (0.2 μCi/100g in ethanol)를 동물을 희생시키기 2시간 전에 복강내로 주사하였다.

이상의 실험동물들을 12시간 금식시킨 후 가벼운 ether 마취하에서 간을 절제하였다.

C. 실험방법

1) Microsome 의 분리방법

흰쥐에서 절제한 간조직을 Potter Elvehjem homogenizer 를 사용하여 0.25-M ice-cold isotonic sucrose 용액으로 25% homogenate 를 만들었다. 이를 냉동원침기 (Damon/Model ice B-20 A) 로 9.000× g 에서 20 분간 원심분리하고 이의 상층액을 다시 9.000×g 에서 10 분간 원심분리하여 침전되는 핵과 mitochondria 층을 제거하였다. 이 상층액을 다시 105.000×g에서 1 시간 동안 초원심분리기 (Beckman/Model L_8-80)로 원심분리하여 침전되는 microsome 을 분리하였고 0.25 M sucrose 로 1g/ml 로 되도록 균질 용액을 만들었다.

2) Cytochrome P-450 의 정량법

Microsomal cytochrome P-450 함량의 측정은 Omura 와 Sato 의 방법[22] 으로 reduced-carbon monoxide complex 에 대한 흡광도를 Perkin-Elmer 554 UV-VIS spectrophotometer 를 사용하여 490 nm 와 450nm 에서 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient는 91 $mM^{-1}cm^{-1}$ 로 하였다.

3) Cytochrome b_5의 정량법

Microsomal cytochrome b_5 함량의 측정은 Smuckler 등의 방법[23] 으로 *cytochrome* b_5 의 환원형과 산화형 사이의 흡광도를 424nm 와 409nm 에서 측정하였다. 이때 molar extrinction coefficient 는 185mM^{-1} cm^{-1} 로 하였다.

4) 단백질 정량법

단백질 함량은 Lowry 등의 방법[24] 으로 발색하여 Spectronic 20(Bauch and Lomb) 을 사용하여 700nm 에서 흡광도를 측정하여 비색정량하였다. 표준용액으로는 bovine serum albumin 을 사용하였다.

5) Ring-hydroxy AAF 와 N-hydroxy AAF 의 측정방법

Ring 과 N-OH AAF 의 측정은 Lotlikar 등의 방법[25] 에 따라 시행하였다. AAF 의 ring-과 N-hydroxylation 을 위한 incubation medium 으로 50mM HEPES buffer (pH 7.8) 0.1mM [9-^{14}C] AAF, 2mM NADPH 및 microsomal fraction 을 넣어 37℃에서 30 분간 incubation 하였다 (Table 1).

Table 1. Incubating medium for AAF hydroxylation

	mM
HEPES buffer, pH 7.8	50.0
NADPH	2.0
AAF containing 0.2 μCi (9-^{14}C-AAF)	0.1
Various microsomal fractions as indicated water to a final volume of 1.0 ml	

Incubated in air for 30 min at 37℃

Incubation 후에 각 시험관에는 4ml 의 ice-cold 1M sodium acetate buffer (pH 6.0) 를 가하여 반응을 중지시키고 즉시 diethylether 를 가하여 hydroxylation 된 대사물을 추출하였다. ring 과 N-hydroxylation AAF 는 cyclohexane : t-butanol · acetic acid : H_2O 가 18 : 2 : 2 : 1 인 용매를 사용하여 *paper chromatography* 로 분리하고 liquid scintillation counter 로 radioactivity 측정 정량하였다.

결 과

A. Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF 와 AAF 를 동시에 투여하였을때 hepatic *microsomal cytochrome* P-450 과 cytochrome b_5 의 함량에 미치는 영향

Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF 와 AAF 를 동시에 투여한 흰쥐 간조직의 *microsomal cytochrome* P-450 의 함량은 다음 표 2 와 같다.

표 2 에서와 같이 cytochrome P-450 함량은 AAF 를 투여한 군 ($P < 0.001$) 과 β-NF 를 투여한 군이 대조군에 비하여 의의있게 증가하였다 ($P < 0.05$). 그리고 AAF 를 투여한 군에 비하여 AAF 와 40I.U. 및 2.000 I.U. vitamin A 를 동시에 투여한 군은 각각 2.532±0.206 및 3.170±0.042 로 의의있게 감소하였다 ($P < 0.001$). 또 AAF 와 0.12 I.U 및 12 I.U. α-tocopherol 을 동시에 투여한 군은 각각 2.021±0.059 와 2.570±0.099 로 의의있게 감소하였다 ($P < 0.001$).

Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF 와 AAF 를 동시에 투여한 흰쥐 간조직의 microsomal cytochrome b_5 의 함량은 다음 표 3 과 같다.

Cytochrome b_5 함량은 AAF 를 투여한 군이 0.038±0.000nmoles 인데 비하여 AAF 와 40 I.U. 및 2.000 I.U. vitamin A 를 동시에 투여한 군은 각각 0.021±0.002 및 0.034±0.004 nmoles 로 의의있게 감소 하였고 ($P < 0.001$) AAF 와 동시에 0.12 I.U. 및 12 I.U. α-tocopherol 을 투여한 군은 각각 0.014±0.000 nmoles 및 0.031±0.002 nmoles 로 의의있게 감소하였다 ($P < 0.001$).

B. Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF 와 AAF 의 동시 투여가 흰쥐 간조직내 AAF 의 hydroxylation 에 미치는 영향

Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF 와 AAF 를 동시에 투여한 후 AAF 의 ring-hydroxylation 과 N-hydr-

Table 2. The level of hepatic microsomal cytochrome p-450 by AAF with vitamin-A α-tocopherol, and β-NF-pretreated rats

Group	Cytochrome P-450	
	(nmoles/0.1ml microsomes)	(nmoles/mg Protein)
Corn oil	5.219 ± 0.194	2.319 ± 0.086
AAF	8.090 ± 0.417*	3.970 ± 0.204*
β-NF	6.635 ± 0.679*	2.664 ± 0.273**
β-NF + AAF	4.630 ± 0.453+	2.267 ± 0.222+
40 I.U. Vitamin A+ AAF	6.305 ± 0.514+	2.532 ± 0.206+
2000 I.U. Vitamin A +AAF	10.235 ± 0.137+	3.170 ± 0.042+
0.12 I.U. α-tocopherol + AAF	3.958 ± 0.117+	2.021 ± 0.059+
12 I.U. α-tocopherol + AAF	6.988 ± 0.270+	2.570 ± 0.099+

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments.
* : Significantly different from control value P ⟨0.001
** : Significantly different from control value P ⟨0.05
+ : Significantly different from AAF value P ⟨0.001.

Table 3. The level of hepatic microsomal cytochrome b_5 by AAF with vitamin-A, α-tocopherol, and β-NF-pretreated rats

Group	Cytochrome b_5	
	(nmoles/0.1 ml microsomes)	(nmoles/mg protein)
Corn oil	0.103± 0.002	0.046 ± 0.001
AAF	0.077 ± 0.001*	0.038 ± 0.000*
β-NF	0.092 ± 0.010	0.037 ± 0.004*
β-NF+ AAF	0.032 ± 0.001+	0.016 ± 0.000+
40 I.U. Vitamin A+ AAF	0.053 ± 0.005+	0.021 ± 0.002+
2000 I.U. Vitamin A+ AAF	0.109 ± 0.015+	0.034 ± 0.004
0.12 I.U. α-tocopherol + AAF	0.027 ± 0.001+	0.014 ± 0.000+
12 I.U. α-tocopherol + AAF	0.083 ± 0.004+	0.031 ± 0.002+

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments
* Significantly different from control value P ⟨ 0.01
+ Significantly different from AAF value P ⟨0.001

oxylation의 변화는 표 4 와 같다.

표 4 에서 보는바와 같이 AAF를 투여한 군에서는 대조군에 비하여 ring-OH AAF는 0.049±0.014nmoles로 의의있게 감소하였으며 (P⟨0.001), N-OH AAF는 0.146 ±0.007 nmoles 로 의의있게 증가하였다 (P⟨0.001). β-NF를 투여한 군에서는 대조군에 비하여 ring- OH AAF는 0.460±0.159 nmoles, N-OH AAF는 0.568 ± 0.212 nmoles 로 모두 의의있게 증가하였다 (P⟨ 0.001).

그리고 AAF를 투여한 군과 비교하여 볼때 AAF 와 β-NF를 동시에 투여한 군에서 ring-OH AAF 는 2.188±0.195 nmoles, N-OH AAF는 1.430± 0.142 nmoles 로 모두 의의있게 증가하였다 (P⟨0.001).

또한 AAF를 투여한 군과 비교하여 볼때 AAF 와 40 I.U. vitamin A를 동시에 투여한 군에서 ring-OH AAF는 0.106±0.023nmoles 로 의의있게 증가하였으며 (P⟨0.001), N-OH AAF는 0.133±0.074nmoles로 통계적인 의의는 없으나 9%감소하였다.

AAF와 2.000 I.U. vitamin A를 동시에 투여한 군에서는 ring-OH AAF는 0.073±0.003nmoles 로 의의있게 증가하였으며 (P⟨ 0.001), N-OH AAF는 0.139 ± 0.038nmoles 로 통계적인 의의는 없으나 5% 감소하였다.

AAF와 0.12 I.U. α-tocopherol을 동시에 투여한 군에서는 ring-OH AAF는 0.083±0.002nmoles 로 의의있게 증가하였으며 (P⟨0.001), N-OH AAF는 0.145 ±

Table 4. Effects of AAF with vitamin-A, α-tocopherol, and β-NF on AAF hydroxylation in young Rat liver microsomes

Group	Ring-hydroxy AAF (n moles/mg protein)	N-hydroxy AAF (n moles/mg Protein)
Corn oil	0.098 ± 0.019	0.077 ± 0.002
AAF	0.049 ± 0.014*	0.146 ± 0.007*
β-NF	0.460 ± 0.159*	0.568 ± 0.212*
β-NF + AAF	2.188 ± 0.195+	1.430 ± 0.142+
40 I.U. Vitamin A + AAF	0.106 ± 0.023+	0.133 ± 0.074
2000 I.U. Vitamin A + AAF	0.073 ± 0.003+	0.139 ± 0.038
0.12 I.U. α-tocopherol + AAF	0.083 ± 0.002+	0.145 ± 0.028
12 I.U. α-tocopherol + AAF	0.065 ± 0.009+	0.099 ± 0.001+

Each value represents mean ± S.D. of experiments
* Significantly different from control value $P < 0.001$
+ Significantly different from AAF value $P < 0.001$

0.028nmoles로 통계적인 의의는 없으나 1%감소하였다.

AAF와 12 I.U α-tocopherol을 동시에 투여한 군에서는 ring-OH AAF는 0.065±0.009nmoles로 의의있게 증가하였으며($P < 0.001$), N-OH AAF는 0.099±0.001nmoles로 의의있게 감소하였다($P < 0.001$).

고 찰

A. Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF와 AAF를 동시에 투여하였을때 hepatic microsomal cytochrome P-450의 함량에 미치는 영향

간조직내 microsome에는 2종류의 전자전달계가 존재한다. 하나는 NADPH-dependent system으로 기질과 산소의 결합장소로 terminal oxidase로 작용하는 cytochrome P-450, NADPH와 cytochrome P-450 사이의 전자전달체인 NADPH-cytochrome C reductase 및 phosphatidyl choline으로 구성되어 있으며 (Fig. 2)[26] 약물 및 발암물질등 지용성 물질의 hydroxylation을 촉매한다[27)-29)].

다른하나는 NADH-dependent system으로 NADPH-dependent hydroxylation 반응의 조절에 영향을 미치는 cytochrome b_5, cytochrome b_5 reductase 및 cyanide-sensitive factor로 구성되어 있으며 지방산의 desaturation과 stearyl-CoA를 촉매한다. 약물대사 능력이 증가할 때는 약물대사 효소계의 중요한 요소인 cytochrome P-450의 농도도 증가한다[30)].

본 실험에서 AAF와 β-NF를 투여한 군의 cytochrome P-450의 함량은 대조군에 비하여 71%가 증가하였다. 이와같이 AAF와 β-NF는 현저한 cytochrome P-450의 유도물질임을 알수 있었다. 이렇게 유도된 cytochrome P-450에 의한 화학물질의 발암현상을 관찰하고자 AAF를 모델화합물로 사용해서 AAF hydroxylation을 측정하였다.

또한 실험동물에서 화학적으로 유도된 carcinogenesis를 여러 항산화제들이 억제함은 알려져 있다[31)]. Vitamin A와 α-tocopherol은 여러화학물질에 의해 유도된 tumor의 효과적인 저해제임이 밝혀졌다. 성등[32)]은 in vitro에서 vitamin A와 α-tocopherol로 함량이 감소됨은 vitamin A와 α-tocopherol의 산화방지제로의 성질에 기인함을 보고하였다.

In vivo에서 실시한 실험에서는 cytochrome P-450의 함량이 AAF를 투여한 군에 비하여 40 I.U. vitamin A와 AAF 및 2,000 I.U. vitamin A와 AAF를 투여한 군에서 각각 36%, 20%가 감소하였고, cytochrome b_5의 함량은 각각 45%, 11%가 감소하였다.

또 0.12 I.U. α-tocopherol과 AAF 및 12 I.U. α-tocopherol과 AAF를 투여한 군에서 cytochrome P-450의 함량이 각각 49%, 35%가 감소하였고, cytochrome b_5의 함량이 각각 63%, 18%가 감소하였다.

이와같이 AAF와 vitamin A와 α-tocopherol 들을 in vivo에서 투여하였을때 AAF에 의하여 유도된 cytochrome P-450의 함량이 저하됨을 관찰하였다. 그러므로 vitamin A와 α-tocopherol들은 대조군 뿐만 아니라 유도물질에 의하여 증가된 효소를 억제시키는 역할을 하였다.

B. Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF와 AAF 의 동시 투여가 흰쥐 간조직내 AAF의 hydroxylation 에 미치는 영향

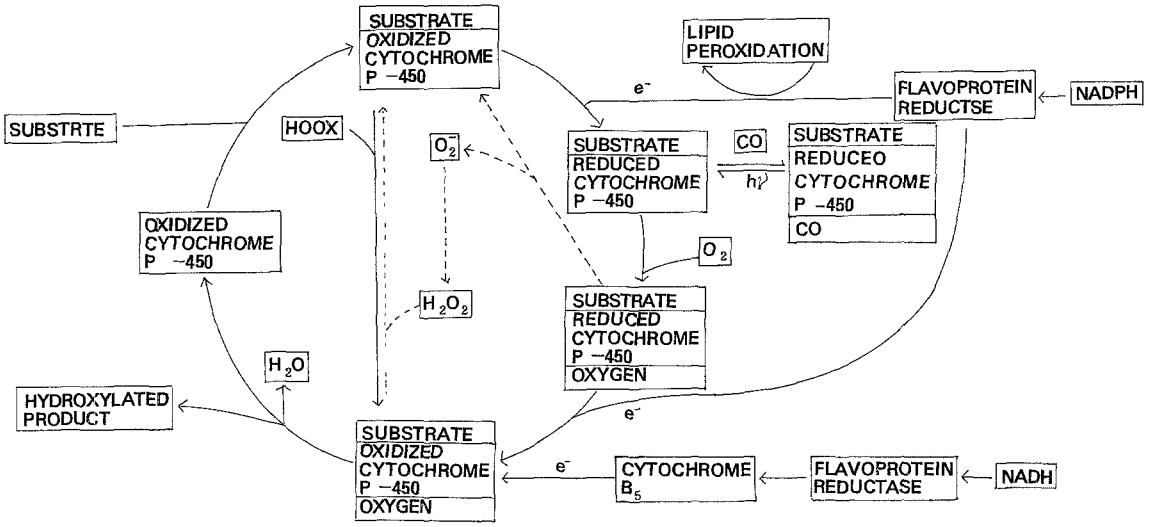

Fig. 2. Reaction mechanism of the cytochrome P-450-dependent microsomal mixed-function oxidase system.

AAF의 hepatic microsomal cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase를 통해 생성된 독성 대사물인 N-OH AAF가 강력한 간암 유도물질 임은 잘 알려져 왔다[5)-7)].

그리고 cytochrome P-450 활성의 변화는 발암원인 AAF의 hydroxylation 과정에 영향을 미치는 것으로도 알려져 왔다[33)].

본 실험에서는 간암 유도물질인 AAF와 vitamin A 및 α-tocopherol을 동시 투여하였을때 그 영향을 측정하였다.

Cytochrome P-450 유도물질인 AAF를 투여하였을때 ring-OH AAF는 50% 감소하였으며, N-OH AAF는 90% 증가하였다. 이는 AAF가 cytochrome P-450의 함량을 유도함으로써 발암물질들의 활성화 단계를 촉진시켜 주는것을 확인하였다.

또한 40 I.U vitamin A와 AAF를 투여하였을때 AAF의 ring-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 감소된 양의 120%가 증가하였고, 2,000 I.U. vitamin A와 AAF를 투여하였을때 AAF의 ring-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 감소된 양의 50%가 증가하였다. 0.12 I.U. α-tocopherol과 AAF를 투여하였을때 AAF의 ring-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 감소된 양의 70%가 증가하였고, 12 I.U. α-tocopherol과 AAF를 투여하였을때 AAF의 ring-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 감소된 양의 50%가 증가하였다.

40 I.U. vitamin A와 AAF를 투여하였을때 AAF의 N-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 증가된양의 10%가 감소하였고, 2,000 I.U. vitamin A와 AAF를 투여하였을때 AAF의 N-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 증가된 양의 50%가 감소하였다.

0.12 I.U. α-tocopherol과 AAF를 투여하였을때 AAF의 N-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 증가된 양의 1%가 감소하였고, 12 I.U. α-tocopherol과 AAF를 투여하였을때 AAF의 N-OH AAF는 AAF만 투여하였을때 증가된 양의 30%가 감소하였다.

그러므로 고농도의 vitamin A와 α-tocopherol의 투여는 저농도를 투여하였을때 보다 N-OH AAF의 형성이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이는 고농도의 vitamin A나 α-tocopherol이 지용성 vitamin이어서 간장에 축적되기 때문이라고 사료된다. Vitamin A와 α-tocopherol이 AAF에 의해 증가된 hydroxylation을 억제시키는 역할은 이들 vitamin의 산화방지제 성질 때문이라는 것을 제시해 준다.

Ring-OH AAF형성이 증가됨은 monophenol로써 sulfate나 glucuronide로 bile에 배설되므로 결국 발암물질의 해독작용을 증가시켜주는 결과이다.

또한 β-NF를 투여하였을때 대조군에 비하여 AAF의 ring-OH AAF와 N-OH AAF가 모두 의의있게 증가하였으며 ($P < 0.001$), β-NF와 AAF를 동시 투여하였을때 AAF를 투여한 군에 비하여 ring-OH AAF와 N-OH AAF가 모두 의의있게 증가하였다 ($P < 0.001$).

이와같이 β-NF와 AAF는 cytochrome P-450유도 물질일 뿐만 아니라 AAF hydroxylation의 활성화 과정에 작용하여 발암물질 생성에 큰 역할을 함을관찰할 수 있었다.

이와같은 결과는 성등[32]이 in vitro로 vitamin A와 α-tocopherol을 투여하였을때 AAF의 N-hydroxylation이 90%이상 감소함을 보고한 바와 비교하여 in vivo로 vitamin A와 α-tocopherol을 투여하였을때 AAF의 N-hydroxylation의 감소량이 낮은것은 in vitr 와 in vivo system의 차이 때문이라고 생각한다.

이상과 같이 어린 흰쥐에 vitamin A와 α-tocopherol의 투여로 간암물질인 AAF의 N-hydroxylation이 감소됨은 이들 vitamin이 AAF의 발암 현상을 억제함을 확인할 수 있었고 성숙한 흰쥐의 in vitro 실험의 결과와 같은 경향을 나타내었다.

결 론

Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF와 AAF를 흰쥐에 동시에 투여하였을때 간조직 microsome내 cytochrome P-450 과 cytochrome b_5함량의 변화와이 효소계를 통하여 대사되는 발암물질인 AAF의 ring-hydroxylation과 N-hydroxylation과정의 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) AAF 및 β-NF를 투여하였을때 hepatic microsomal cytochrome P-450의 함량이 대조군에 비하여 증가하였고, cytochrome b_5는 감소하였다.

2) Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF를 AAF와 동시에 투여하였을때 hepatic microsomal cytochrome P-450과 cytochrome b_5의 함량은 AAF에 의한 증가량만큼 감소하였다.

3) AAF를 투여하였을때 대조군에 비하여 ring-hydroxylation은 감소하였으며, N-hydroxylation은 증가하였다.

4) β-NF를 투여하였을때 또 β-NF와 AAF를 동시에 투여하였을때 대조군에 비하여 ring-hydroxylation과 N-hydroxylation과정 모두 증가하였다.

5) Vitamin A, α-tocopherol 및 β-NF를 AAF와 동시에 투여하였을때 AAF를 투여한 군에 비하여 ring-hydroxylation은 증가하였으며, N-hydroxylation은 감소하였다.

REFERENCES

1) Gillette JR : Factors affecting drug metabolism. Ann NY Acad Sci, 1971 ; 179:43-66.

2) Goodman Louis S and Alfred Gilman : The pharmacological basis of therapeutics, 6th ed, New York, Macmillan Publishing Co, 1980.

3) Lu AYH : Liver microsomal drug-metabolising enzyme system, functional components and their properties. Fed Proc, 1976 ; 35 : 2460-2463.

4) Mcluen EF and Fouts JR : The effects of obstructive Jaundice on metabolism in rabbit, J pharmac Exp Therap, 1961 ; 131 : 7-11.

5) Gutmann HR and Bell P : N-hydroxylation of arylamides by the rat and guinea pig. Evidence for substrate specifcity and participation of cytochrome p-450, Biochem, Biophys. Acta, 1977 ; 498 : 229-243.

6) Thorgeirrson SS and Jellow DJ Jellow HA Sasame Green I and Mitchell JR : Tho role of cytochrome p-450 in N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene. Mol, Pharmacol, 1973 ; 9 : 398-404.

7) Miller EC Miller JA and Hartmann HA : N-hydroxy-2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat. Cancer Res,1961; 21 : 815-824.

8) Heidelberger C : Chemical carcinogenesis, Ann. Rev Biochem, 1975 ; 14 : 79-121.

9) Bollag W : Vitamin A and Vitamin A acid in the prophylaxis and therapy epithelial tumors. Intern J Vitamin Res, 1970 ; 40 : 299-313.

10) Weltenberg LW : Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin J Natl Cancer Inst, 1972 ; 48 : 1425-1431.

11) Sporn MB Dunlog NM Newton DL and Smith JM : Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids) Fed Proc, 1976 ;315: 1332-1338.

12) Davies RE : Effect of vitamin A on 7.12-Dimethyl-benz(α) anthracene-induced Papillomas in rhino mouse skin, Cancer Res, 1967 ; 27 : 237-241.

13) Newberne PM and Suphakarm V : Preventive role of vitamin A in colon carcinogenesis in rats. Cancer, 1977; 40 : 2553-2556.

14) Bollag W : Therapy of chemically induced benign and malignant epithelial tumors by vitamin A acid (retinoic acid), European J Cancer, 1972 ; 8 : 689-693.

15) Sporn MB : Retinoids and Carcinogenesis,Nutr Rev, 1977 ; 35 : 65-69.
16) Verma AK and Boutwell RK : Vitamin A acid (Retinoic acid), a potent inhibitor of 12-0-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate — induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis, Cancer Res, 1977 ; 37 : 2196-2201.
17) Bollag W: Prophylaxis of chemically induced epithelial tumors with an aromatic retinoic acid analog. European J Cancer, 1975 : 11 : 721-724.
18) Genta VM, Kaufaman DG, Harris CC, Smith JM, Sporn MB and Saffiotti U : Vitamin A deficient enhances binding of benzo (α) pyrene to tracheal epithelial DNA Nature cond 1974; 247 : 48-49.
19) Saffiontt U, Moniesano R, Sellakumar AR and Borg SA : Experimental cancer metaplasia and squamous cell tumors cancer, 1967 : 20 : 857-864.
20) Slaga TJ and Brachen WM : The effects of antioxidants on skin tumor initiation and aryl hydrocarbon hydroxylase, cancer Res, 1977; 37: 1631-1635.
21) Haugen DA Coon MC and Nebert DW: Induction of multiple forms of mouseliver cytochrome p. 450. J Biol chem, 1976; 251: 1817-1827.
22) Omura T and Sato R : Carbon monoxide binding pigment of liver microsomes-II. Solubilization. puification and properties. J Biol chem, 1964 : 239 : 2370-2378.
23) Smuckler 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: 55-64.
24) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Ranclall RT : Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol chem, 1951 ; 193 : 265-275.
25) Lotlikar PD, Wertmar K and Luha L : Role of mixed function amine oxidase in N-hydroxylation of 2-AAF by hamster liver microsomal preparations. Biochem J, 1973 : 136 : 1137-1140.
26) Ernest Hodgson and Frank E Guthrie :Introduction to biochemical toxicology. 2nd Ed : 72 New York Elsevier 1982.
27) Lu AYH, West SB, Vore M, Ryan D and Levin W : Role of cytochrome b_5 in hydroxylation by a reconstituted cytochrome p.450 containing system, J Biol chem, 1974 ; 249 : 6701-6709.
28) Anders JF and Adhip PN : Influence of tryptophan on the level of microsomal cytochrome p-450 in well-fed normal, adrenalectomized and phenobarbital treated rats, Biochem. Biophy Acta 1976 : 443 : 453-460.
29) Miller ON : Nutrition and drug metabolism. Fed Proc, 1976; 35 : 13 : 2459-2485.
30) Long RF : Introduction of drug metabolizing enzymes and cytochrome p-450, Biochem J 1969 ; 115 : 26.
31) Wattenberg LW : Inhibitors of chemical carcinogenesis. Adv Cancer Res, 1978 ; 26 : 197-226.
32) 성낙응 · 홍영숙 : 흰쥐에 vitamin antioxidant 투여가 2-Acetylaminofluorene hydrorylation에 미치는 발암억제작용. 의화의대지 제5권 제3호 1982 ; pp. 99-107.
33) Kaplan E Gutmann HR and Emory TH : Microsomal metabolism of arylamides by the rat and guinea pigs. Biochem Pharmacol, 1978 ; 27 : 1581-1589.