

Lipid Peroxide가 Benzo(a)pyrene의 대사에 미치는 영향 (I)

요품과

강 은 미·김 도 정·김 진 곤

Study on the Metabolism of Benzo(a)pyrene Mediated by Lipid Peroxide (I)

Cosmetic Division

Eun Mee Kang, Do Jung Kim and Jin Gon Kim

= Abstract =

Lipid Peroxidation is a complex process known to occur by the formation and propagation of lipid radicals in biological system. And then, this is largely mentioned as the NADPH dependent enzymic peroxidation and the ascorbate dependent nonenzymic peroxidation. Recently, benzo(a)pyrene as the pollutant detected in environment has been studied about the oxidative metabolism in these systems. And also authors learn that the metabolites of benzo(a)pyrene by artificially induced lipid peroxide in Fe/ascorbic acid system give a difference in TBA value used in detection of lipid peroxide. Therefore, to study the influence of lipid peroxide on the oxidative metabolism of the benzo(a)pyrene, we tried as follows; 0, 50, 100, 200 and 400 ul supernatants of liver homogenate with or without variable concentrations of benzo(a)pyrene were applied in the 1 mM or 5 mM-FeSO₄/ascorbic acid system, respectively. The lowest TBA value was shown in 10 ul and 100 ul/DMSO 100 ul concentrations of benzo(a)pyrene.

서 론

1956년 Harman은 “노화과정은 세포나 조직에 생기는 radical이 일으키는 연속적인 유해반응에 의한 상해의 축적이다” 라고 언급하고 있는데 여기서 radical은 호기성 호흡을 하는 생물이 electron transport system에 따라 산소 이용시에 산소의각의 parallel electron spin을 나타내는 2개의 unpaired electron이 단계적으로 환원될때 생성되는 것으로 lipid peroxide은 특히 생

체막의 인지질이 free radicals에 의해 이중결합이 공격받아 공액이중결합으로 변형되면서 연쇄반응을 통해 분해되고, 동시에 인접되어 있는 고급 불포화 지방산의 이중결합이 연쇄반응에 참여하여 형성된다.

이러한 기전을 통해 free radical은 lipid peroxide의 형성을 유도하여 세포막의 stability 및 flexibility에 영향을 주고, aging 및 성인병에 중요한 역할을 하며, 또한 mutation 및 cancer initiator로 작용하여 생체방어 기전의 측면에서 그 기전에 대한 많은 연구가 이뤄지고 있다¹⁾.

최근에는 산업의 발달과 함께 인체 및 환경생태계에 유해한 환경물질이 증가하는 추세에 있다. 다양한 환경 오염원 중에서 procarcinogen이나 mutagen 등이 많이 검출되고 있는데 이들은 free radicals로 작용할 뿐만 아니라 lipid peroxide에도 영향을 주는 밀접성을 갖고 있다.

대표적인 환경 오염물질인 benzo(a)pyrene(이하 BAP으로 표기)은 미생물을 이용한 변이원성 시험인 Ames test에 의해 그 mutagenicity에 대해 많이 보고 되고 있다²⁾.

이 mutation은 BAP의 oxidative metabolite가 DNA와 결합하여 DNA변성 및 염기쌍 분열을 초래하여 일어나며 BAP의 oxidation metabolism의 진행은 두 기전으로 분류될 수 있다.

첫째로는 microsomal mixed function oxidation dependent system에 의해서고, 두번째는 lipid peroxide mediated oxidation system인데 이러한 경로를 통해 BAP은 최종 대사체인 diol epoxide의 구조-활성상관 관계(bay region-carcinogenic activity)에 따라 대사된다. 최근에 특히 후자의 기전에 따라서 diastereomeric isomer중 (-)anti diolepoxide가 많이 형성되고 이것은 Syn-diol epoxide보다 더 강한 carcinogenicity를 나타낸다고 한다³⁾. 즉, BAP의 oxidation은 NADPH 또는 NADH dependent enzyme system 및 nonenzyme system induced lipid peroxide mediation과 연관되어 있고, lipid peroxide는 biological oxidation 산물로 생체에 대해 mutation 혹은 cancer와 밀접한 관계를 갖고 있다. 그러므로 BAP의 oxidative metabolites의 기전 규명을 통해서 antioxidant effect를 가지는 chemicals의 항산화 및 항돌연변이성 - BAP의 ultimate carcinogen인 toxic metabolite로의 대사를 억제시키거나 또는 detoxification system의 활성화를 유도 - 으로부터 검색할 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 본 실험의 저자들은 oxidative system이 BAP의 대사에 미치는 영향을 알아보고자, lipid peroxide를 형성시키고 그에 따른 BAP의 대사를 검토하고자 하였다.

우선 이 논문에서는 lipid peroxide의 형성조건 및 BAP의 대사농도를 TBA method를 이용하여 결정할 수 있었기에 다음과 같이 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

Benzo(a)pyrene, Corn oil: Aldrich chemical company

FeSO₄·7H₂O: Hayashi pure chemical Ind. Ltd., L-Ascorbate, 6-Thiobarbituric acid, Trichloroacetic acid, Protein assay kit: Sigma chemical company

그외의 시약은 특급품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 간 homogenate suspension의 조제

Ames의 방법⁴⁾에 따라서 약 200~250 g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat에 corn oil을 5일간 계속 10 ml/kg 경구투여한 뒤 다음날 희생시켜 간의 portal vein을 통해 냉 0.15M KCl 용액으로 관류하여 간내의 혈액을 제거한 후 적출하고 3배량의 냉 0.15M KCl 용액을 가하여 Potter-Elvahje형 homogenizer로 빙수냉각하에서 균질화하였다.

Refrigerated centrifuge 9000 g에서 30분간 원심분리하여 상층분획(S9 fraction)을 취하여 항저온 microtube에 1~2 ml씩 분주하였으며 Bovine serum albumine을 standard로 하여 S9 fraction중의 protein 함량을 lowry법⁵⁾으로 측정하였다.

2) Lipid Peroxide의 측정

과산화지질의 분해로 생성되는 malon-dialdehyde(이하 MDA로 표기)는 산성조건하에서 2분자의 thiobarbituric acid(이하 TBA로 표기)와 축합하여 적색물질을 형성하는데, 이것은 535 nm 부근에서 최대 흡광치를 가지므로 그 흡광치의 detection이 가능하다.

TBA method는 臭杉文紆, 内山, 三原 및 Buege·Aust의 방법 등이 과산화지질실험⁶⁾에 보고되고 있는데 본 실험은 Buege·Aust의 방법을 이용하였다. 즉, 인위적으로 유발시킨 과산화지질 반응물질에 동량의 TCA-TBA-HCl 시액*(이하 TTH로 표기)을 가하고 수욕상에서 15분간 가온한 후 실온으로 냉각시키고 butanol을 가하여 진탕추출한 뒤 3000 g에서 10분간 원심분리하여 Beckman Du 70 spectrophotometer 535 nm에서의 그 흡광치(TBA value)로서 lipid peroxide을 측정하였다.

*TCA-TBA-HCL reagent: 15% w/v Trichloroacetic acid; 0.375% w/v Thiobarbituric acid; 0.25 N -HCL.

3) Lipid Peroxide의 유도과 BAP의 대사

Wills 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 과산화지질의 형성을 유도하였다. 간기하면 다음과 같다.

reaction mixture 은 0.02M PBS buffer (pH 7.4) 500 μ l, 일정 S9 농도, 1mM 또는 5mM FeSO₄ 및 1mM 또는 5mM ascorbate의 농도로 총량을 1ml로 만들고 BAP를 가하거나 가하지 않고 37°C에서 shaking incubation하여 TBA value를 측정하였다.

결과 및 고찰

Wills 등의 방법을 변형하여 lipid peroxide mediated BAP oxidation을 유도시켰다. S9 fraction (protein 25.8 mg/ml) 0, 50, 100, 200 및 400 μ l 각각에 0.02M Phosphate Buffer (이하 PBS로 표기) 500 μ l 및 1mM-FeSO₄/1mM-ascorbic acid 또는 5mM-FeSO₄/5mM-ascorbic acid의 reaction mixture 1ml을 37°C에서 30 incubation한 후 얻은 TAB value의 변화는 Fig. 1 및 2와 같다.

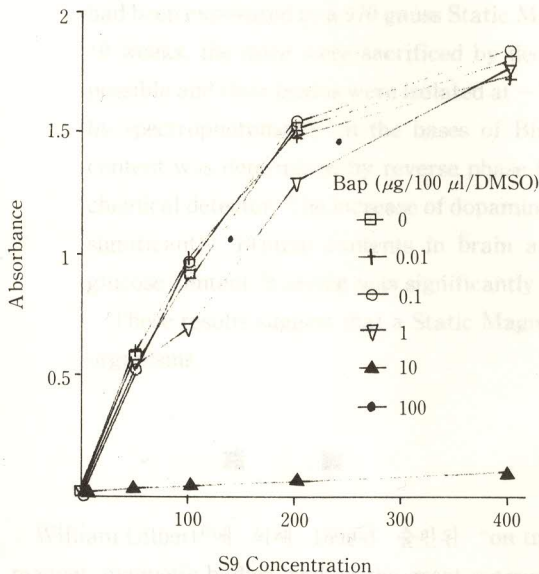


Fig. 1. 1 mM-FeSO₄/1 mM-Ascorbic acid system induced lipid peroxid with the variable S9 and BAP concentration.

이상의 실험으로 부터 Lipid Peroxide Mediated BAP Metabolism에 미치는 TBA value의 변화는 S₉ 농도 0, 50, 100, 200 및 400 μ l에 따라 그 TBA value도 증가하다가 BAP의 농도 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 μ g을 가하면 10 μ g 및 100 μ g에서 그 TBA value가 현격하게 저하되었다. 이러한 현상은 TBA 반응물질인 lipid peroxide의 형성이 BAP에 의해서 억제되었기 때문으로, 이때 BAP은 산화적 대사를 받는다고 생각된다.

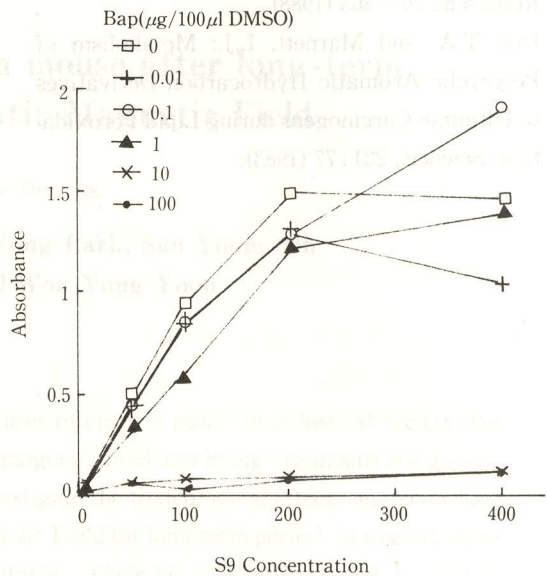


Fig. 2. 5 mM-FeSO₄/5 mM-Ascorbic acid system induced lipid peroxide with the variable S9 and BAP concentration.

이에 대하여 Wills 등⁷⁾은 그 BAP의 Oxidative Metabolites을 HPLC을 이용하여 확인하였으며, 또한 그 대사물에 대한 Mutagenicity의 증가를 Sister Chromatid Exchange Test로 확인, 보고하였다⁷⁾.

그러므로 본 실험의 저자들은 이상의 결과를 바탕으로 항산화활성을 갖는 생약 혹은 Chemicals의 Antioxidation relative Anti-or Demutagenicity의 작용을 TBA reactive materials와 BAP과의 반응에 따른 metabolites를 확인, 정량함으로서 미생물을 이용한 Mutagen Screening Test인 Ames Method와 더불어 그 Chemopreventive effect의 기전을 규명하여 보고자 한다.

참고 문헌

1. Simic, M.G.: Mechanisms of Inhibition of Free-Radical Processes in Mutagenesis and Carcinogenesis. *Mutation Research.*, 202 : 377 (1988).
 2. Hochstein, P. and Atallah, A.S.: The Nature of Oxidation and Antioxidant Systems in the Inhibition of Mutation and Cancer. *Mutation Research.*, 202 : 363 (1988).
 3. Dix, T.A. and Marnett, L.J.: Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives to Ultimate Carcinogens during Lipid Peroxidation. *Science.*, 221 : 77 (1983).

4. Ames, B.N. and Maron, D.M.: Revised Method for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutation Research.*, 113 : 173 (1983).
 5. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265 (1951).
 6. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal Electron Transport and Cyt P-450 Microsomal Lipid Peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 52 : 302 (1978).
 7. McNell, J.M. and Wills, E.D.: Formation of Mutagenic Products of Benzo(a)pyrene Mediated by Lipid Peroxidation. *Life chemistry reports.*, 3 : 150 (1985).

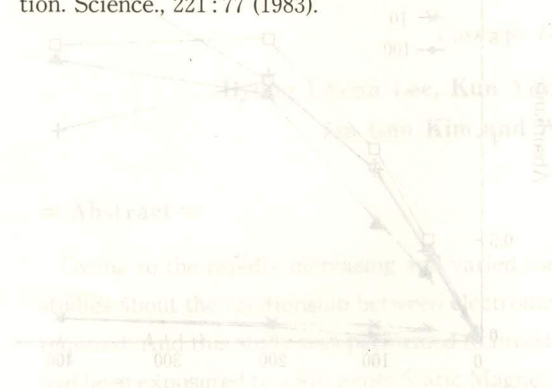


Fig. 1. Effect of BAP concentration on the formation of lipid peroxide with the variable 20 and 50 μM Ascorbic acid in 5 mM FeSO₄ and 5 mM Ascorbic acid system in 100 μM DMSO.

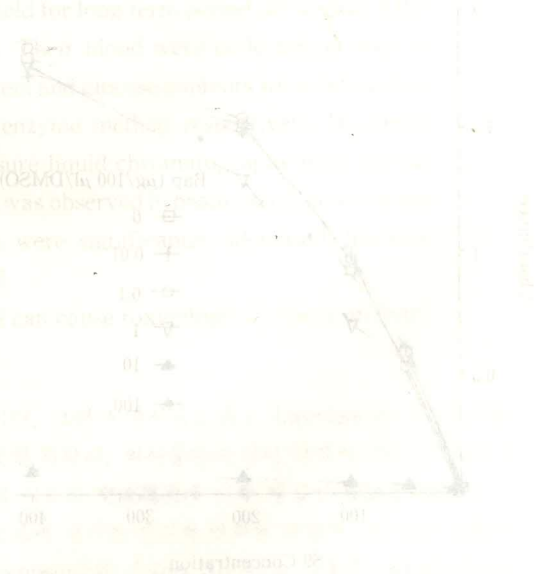


Fig. 2. Effect of BAP concentration on the formation of lipid peroxide with the variable 20 and 50 μM Ascorbic acid in 5 mM FeSO₄ and 5 mM Ascorbic acid system in 100 μM DMSO.