

합성 Retinoid의 항산화 효과

생약과

강춘원 · 양기숙 · 윤원용

Antioxidant Effects of Synthetic Retinoids

Division of Herb Drug

Choonwon Kang, Kisook Yang and Wonyoung Yoon

= Abstract =

Synthetic retinoids (tretinoin, isotretinoin, acitretin, etretinate, arotinoid, termarotene, Ro 40-8757) were assayed for their antioxidant effect on lipid peroxidation.

Retinoids were not shown linear dose-response relationship in the inhibition on the Fe²⁺/ascorbic acid-induced lipid peroxidation. Antioxidant effects of retinoids were abruptly increased at the critical concentration. Retinoids, had β -ionone ring, showed more potent antioxidant effect than others.

緒 論

Benzo[a]pyrene은 MFO (mixed function oxidase system)에 의해서 대사활성화되어 그 독성을 발현하지만, 최근에는 脂質 過酸化 過程에서 生成되는 hydroxy radical, peroxy radical 등이 benzo[a]pyrene의 代謝 活性化에서 중요한 役割을 하는 것으로 보고되었다¹⁾. Marnett 등²⁾은 脂質 過酸化에 의해서 benzo[a]pyrene 7,8-diol이 最終 發癌物質形態인 benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide로 酸化될 수 있다고 보고하였다.

一般的으로 benzo[a]pyrene 7,8-diol이 epoxidation되면 anti-form과 syn-form 두 種類의 立體異性質體가 生成되며 anti-form이 syn-form 보다 더욱 毒性이 강하다. 脂質 過酸化에 의한 peroxidative epoxidation은 MFO-dependent epoxidation에 비해 anti-form의 Benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide로

變換이 약 2.5배 정도 많이 이루어지는 立體化學的 特徵을 가지며, benzo[a]pyrene 4,5-diol, benzo[a]pyrene 9,10-diol은 epoxidation시키지 못하고 毒性이 강한 bay region diol인 benzo[a]pyrene 7,8-diol만을 epoxidation시키는 特徵 때문에 脂質 過酸化는 benzo[a]pyrene 代謝過程에 있어서 典型的인 代謝經路로 알려진 MFO system과 함께 注目되고 있다^{3,4)}.

MFO system에 의한 benzo[a]pyrene의 代謝는 哺乳動物에 있어서 거의 대부분이 肝臟에서 이루어진다⁵⁾. 그러나 脂質 過酸化는 生體內 모든 部分에서 광범위하게 이루어질 수 있으며, 또한 脂質 過酸化 過程에서 生成된 hydroxy radical, peroxy radical 등이 위와 같은 benzo[a]pyrene의 代謝活性化에 關與하기도 하지만, 그 자체로서도 突然變異, 細胞變換을 일으킬 수 있기 때문에 癌 誘發 原因으로서 주목받고 있기도 하다⁶⁾.

따라서 本 研究에서는 retinoid의 脂質 過酸化에 대한 抑制效果를 比較하기 위하여 rat liver homogenate로

부터 抽出한 磷脂質을 基質로 하여 脂質 過酸化 모델을 만들고, 7種 retinoid의 抗酸化效果를 實驗하였다.

實驗 材料 및 方法

1. 實驗 材料

本 實驗에 사용된 7種의 合成 retinoid는 F. Hoffmann-La-Roche LTD.(Dept. PRPD, CH-4002 Basel, Switzerland)의 Dr. Klaus로부터 提供받았으며, retinol palmitate와 比較物質로 사용된 BHT (butylated hydroxytoluene), α -tocopherol 은 Sigma Chemical Co., β -carotene은 和光純藥 工業(株) 製品를 사용하였다.

2. 實驗 方法

1) Rat liver 中の 磷脂質의 抽出과 liposome solution의 製造方法

脂質 過酸化의 基質로서 生體膜의 主要한 構成成分이며, 不飽和 脂肪酸이 豊富한 磷脂質을 rat liver homogenate로부터 赤松⁷⁾, Terao 등⁸⁾의 方法에 따라 抽出하였다. 生體膜의 蛋白質과 結合되어 있는 磷脂質을 추출하기 위하여 極性溶媒인 methanol과 結合이 깨진 脂質分子를 抽出하기 위한 非極性溶媒 chloroform의 混合溶媒를 사용하였다.

사용된 抽出溶媒는 溶存된 酸素의 影響을 防止하기 위하여 窒素 氣로 충분히 purging시킨 후 사용하였으며 變化를 防止하기 위하여 迅速히 처리하였다. 抽出된 磷脂質은 chloroform-methanol(2:1) 混合 溶媒에 녹아 있는 狀態로 密閉容器에 넣어 冷暗所에서 保管하였다.

抽出液 中の 磷脂質 含量을 구하기 위하여 抽出液 10, 20, 40, 80ml를 취하여 段階의 減壓濃縮하고 最終的으로 濃縮 flask 自體 무게로 인한 誤差를 除去하기 위하여 特別히 製作된 10ml flask에서 減壓濃縮하였다. 減壓 脱水기에서 恒量으로 한 후, 前後의 重量差로 磷脂質의 量을 구하고 檢量線을 작성하여 抽出液 1ml당 磷脂質의 量을 산출하였다.

脂質 抽出液 일정량을 취하여 減壓濃縮 乾固시킨 후 pH 7.4, 0.02M phosphate buffer를 가하여 40°C에서 10분간 ultrasonification시켜 liposome solution을 제조하였다.

2) Fe²⁺/ascorbic acid system에 의한 脂質 過酸化의 誘發

試驗管에 liposome solution 100 μ l를 넣고 pH 7.4, 0.02M phosphate buffer 500 μ l를 가하여 37°C에서 5분간 放置한 후, 1mM FeSO₄, 100 μ l, 1mM ascorbic acid 100 μ l를 initiator로 가한 후 37°C에서 30분간 振湯 培養하여 脂質 過酸化를 유발시켰다.

3) Thiobarbituric acid test에 의한 脂質 過酸化의 測定

誘發된 脂質 過酸化를 측정하기 위하여 Buege 등⁹⁾의 方法에 따라 振湯培養液에 Trichloroacetic acid-Thiobarbituric acid-HCl(TCA-TBA-HCl) reagent 4ml를 가하고 100°C 熱湯 中에서 15분간 가열하였다. 室溫까지 冷却시킨 후 浮遊物들을 제거하기 위하여 refregenerated centrifuge(R.C.F.) 1000 \times g에서 10분간 遠心分離시켰다. 赤色을 더는 上清液을 취하여 535 nm에서 吸光度를 측정하고 molar extinction coefficient를 $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 로 하여 脂質 過酸化의 最終 分解產物인 malondialdehyde의 量을 계산하였다. 磷脂質 抽出液의 量과 liposome solution의 濃度는 여러 段階의 實驗을 거쳐 적절한 吸光度 範圍에 들도록 조절하고, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 溶劑로 retinoid와 比較物質을 10배수의 5段階 濃度로 가하여 retinoid의 脂質 過酸化에 대한 抑制效果를 실험하였다.

實驗 結果

1. 脂質 過酸化 誘發 System의 最適條件

脂質 抽出液에서 重量法에 의해 抽出液 中 磷脂質의 量을 算出하고 약 100mg 磷脂質 相當量인 脂質 抽出液을 濃縮하여 pH 7.4, 0.02M phosphate buffer를 각각 10, 50, 100, 200ml씩 가하여 ultrasonification시켜 4가지 濃度의 liposome solution을 얻었다. 各 濃度의 liposome solution을 다시 pH 7.4, 0.02M phosphate buffer를 가하여 각각 5단계의 濃도로 희석하고 1mM FeSO₄, 100 μ l, 1mM ascorbic acid 100 μ l를 가하여 脂質 過酸化를 誘發시킨 結果는 Fig. 1과 같다.

10ml의 0.02M phosphate buffer를 가하여 얻어진 liposome solution은 100 μ l 以上の 濃度에서는 容量-反應의 直線性을 상실하였고, 다른 濃度의 liposome solution들은 50 μ l-200 μ l 範圍에서 양호한 直線性을 나타내었다. 따라서 약 磷脂質 100mg 相當量의 脂質 抽出

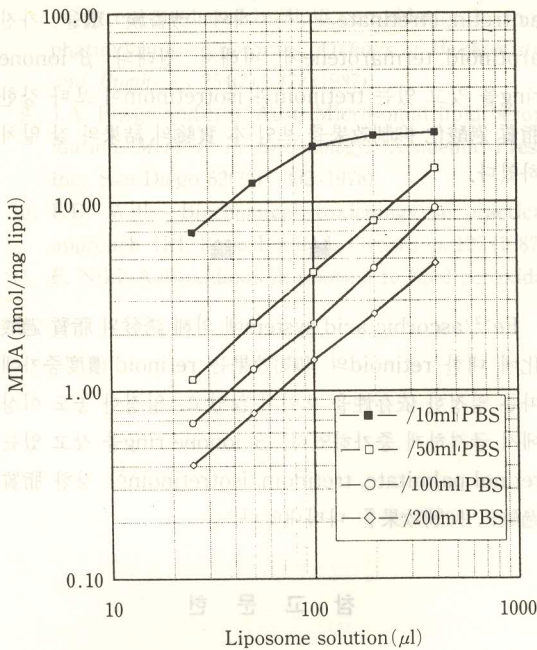


Fig. 1. The effect of liposome solution concentration on Fe²⁺/ascorbic acid-induced lipid peroxidation.

액을 농축하고 0.02M phosphate buffer 50ml를 가하여 ultrasonification시켜 얻어진 liposome solution을 基質로 하여 retinoid의 脂質 過酸化 抑制效果를 시험하였다.

2. Retinoid의 脂質 過酸化 抑制效果

Retinoid의 脂質 過酸化 抑制效果는 Fig. 2와 같이 retinoid의 濃度증가에 따라 依存性을 찾아내기 어려웠으며, 일정한 臨界濃度에서 급격히 증가하였다. tretinoin의 경우 10⁻²mM에서는 10.8%이었지만, 10⁻¹mM에서는 87.6%의 抑制效果를 나타내었다. 10⁻¹mM-10⁻²mM 사이에서 濃度段階를 더욱 細分化하여 시험한 結果에서도 동일한 形態의 급격한 변화를 나타내었다.

Table I과 같이 抗氧化劑인 BHT가 10⁻²mM에서 95.5%의 강한 脂質 過酸化 抑制效果를 보였으며, tretinoin과 isotretinoin은 10⁻¹mM에서 각각 87.6%, 94.4%로서 retinoid 중에서 가장 강한 抑制效果를 나타내었다. 構造 중에 β-ionone ring을 가지고 있는 acitretin, etretinate가 상당한 抑制效果를 보인 데 반하여 두 개의 芳香族 環을 가진 arotinoid와 termarotene은 약한 抑制效果를 나타내었다. 그러나 유사한 構造의

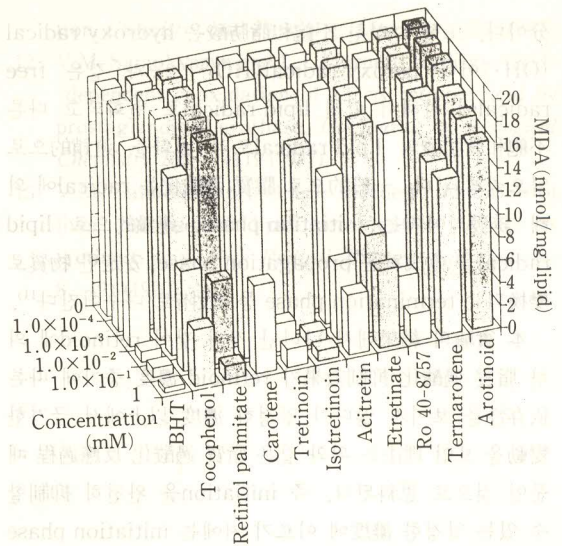


Fig. 2. The inhibitory effect of retinoids on the Fe²⁺/ascorbic acid-induced lipid peroxidation.

Table I. The inhibition percent of retinoids on Fe²⁺/Ascorbic acid-induced lipid peroxidation.

	Concentration (mM)				
	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	1
BHT	1.6	12.9	95.5	95.9	97.8
α-Tocopherol	0.4	1.7	20.8	55.5	74.9
β-Carotene	1.2	7.5	8.1	8.6	60.5
Retinol palmitate	1.1	4.3	7.2	62.8	93.8
Tretinoin	0.8	6.9	10.8	87.6	91.9
Isotretinoin	0.5	4.0	18.9	94.4	95.3
Acitretin	0.7	2.8	33.8	66.0	73.2
Etretinate	1.2	6.5	13.0	55.6	64.7
Arotinoid	1.1	2.6	9.4	13.0	17.3
Termarotene	0.5	5.7	5.9	27.8	29.0
Ro 40-8757	0.8	13.0	19.3	77.1	87.4

Ro 40-8757은 강한 抑制效果를 나타내었다.

考 察

Lipid peroxidation은 單純히 飲食物 중에 包含된 不飽和脂肪酸이 酸素에 의해서 쉽게 過酸化되어 酸敗되는 過程으로만 간주되었으나, 生體內에서의 發生 可能性과 그 深刻한 毒性學的 危險性 때문에 關心이 集中되고 있다¹⁰⁾. 특히 不飽和脂肪酸은 生體 組織 중에서 membrane에 豊富히 存在하는 燐脂質의 重要한 構成分

분이다. 또한 그러한 불飽和脂肪酸은 hydroxy radical (OH·)이나 peroxy radical (HO₂·) 등과 같은 free radical에 의해서 쉽게 lipid radical로 변화되고 다른 불飽和脂肪酸의 lipid radical로의 변화를連鎖적으로 일으키게 된다. 一般적으로 脂質 過酸化는 radical에 의해 誘發되어지는 initiation phase, 連鎖적으로 lipid radical을 生成하는 propagation phase, 安定한 物質로 變換되는 termination phase 등 3段階로 나누어진다¹¹⁾.

本實驗의 結果에서 나타난 것과 같이 retinoid에 의한 脂質 過酸化 抑制效果가 retinoid 濃度 증가에 따른 依存性을 보이지 않다가 일정한 濃度 以上에서 급격한 變動을 보인 理由는 위와 같은 脂質 過酸化 反應過程 때 문인 것으로 思料된다. 즉 initiation을 완전히 抑制할 수 있는 일정한 濃도에 이르기 전에는 initiation phase에서 抑制되지 못한 一部 radical들이 propagation phase에서 連鎖反應에 의해서 lipid radical을 生成하여 retinoid의 抑制效果를 충분히 나타내지 못하지만, 일정한 濃度 以上에서는 initiation phase에서 radical들을 완전히 抑制하여 propagation phase에서 전혀 lipid radical을 生成하지 못하게 하여 抑制效果의 급격한 變動을 일으키는 것으로 推定되지만 억제제의 규명을 위해서는 보다 다각적인 연구가 필요할 것이다.

두 개의 芳香族 環을 가지고 있는 3世代 合成 retinoid 중에서 polar terminal group을 갖고 있지 않은 Ro 40-8757이 다른 것에 비해 강한 脂質 過酸化 抑制效果를 나타내었고, polar terminal group이 CH₂OH와 COOH로 서로 다른 retinol palmitate와 tretinoin, isotretinoin은 1mM 濃度에서 거의 同等한 程度의 效果를 나타낸 本實驗의 結果로부터 polar terminal group이 脂質 過酸化 抑制效果에 큰 影響을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

Samokyszyn 등^{12,13)}은 isotretinoin이 prostaglandin H synthase에 의해서 hydroperoxide-dependent oxidation을 일으키며, 效果의인 peroxidase-reducing cosubstrate이기 때문에 강한 脂質 過酸化 抑制效果가 있음을 보고하였다. 또한 isotretinoin의 脂質 過酸化에 의한 代謝物을 분석한 結果, β-ionone ring의 C5와 C8이 epoxidation된 5,8-oxy-13-cis-retinoic acid가 主要한 代謝產物이라고 보고하였다.

이러한 結果는 β-ionone ring이 radical들의 主要한 反應 부위이며, 脂質 過酸化 抑制效果에서 主要한 役割을 하고 있음을 意味한다. β-ionone ring이 芳香族化된

acitretin, etretinate과 두 개의 芳香族 環을 가진 arotinoid, termarotene에 비해서 원래의 β-ionone ring을 갖고 있는 tretinoin과 isotretinoin이 보다 강한 脂質 過酸化 抑制效果를 보인 本實驗의 結果와 잘 일치하였다.

結 論

Fe²⁺/ascorbic acid system에 의해 誘發된 脂質 過酸化에 대한 retinoid의 抑制效果는 retinoid 濃度 증가에 따른 일정한 依存性을 보이지 않았고, 일정한 濃도 以上에서 급격하게 증가하였다. β-ionone ring을 갖고 있는 retinol palmitate, tretinoin, isotretinoin이 강한 脂質 過酸化 抑制效果를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. J.F. Waterfall and P. Sims: Epoxy derivatives of aromatic polycyclic hydrocarbons: The preparation and metabolism of epoxides related to benzo[a]pyrene and to 7,8-and 9,10-dihydro benzo[a]pyrene. *Biochemical Journal* 128 : 265 (1972).
2. L.J. Marnett: Hydroperoxide-dependent oxygenation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their metabolites. *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis* 12 : 307 (1985).
3. T.A. Dix and L.J. Marnett: Detection of the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc., San Diego 105, 43, 347 (1984).
4. R. Scurlock, M. Rougee and R.V. Bensasson: Redox properties of phenols, their relationships to singlet oxygen quenching and to their inhibitory effects on benzo[a]pyrene-induced neoplasia. *Free radical research communications*. 8, 4-6, 251 (1990).
5. A.P. Alvares and W.B. Pratt: Principles of drug action: The basis of pharmacology. 3rd Ed. Churchill Livingstone Inc., New York, p. 369 (1990).
6. M.G. Simic: Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 202 : 377 (1988).
7. 赤松 穰: 新 生 化 學 實 驗 講 座 4. 脂 質 II-리 ン 脂 質-. 日 本 生 化 學 會 編 東 京 化 學 同 人 (株), 東 京 (1991).
8. J. Terao, B.P. Lim, H. Murakami and S. Matsushita: Quinone formation from carcinogenic benzo

- [a]pyrene mediated by lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 254(2) : 472 (1987).
9. J.A. Buege and S.D. Aust: Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.*, Academic Press, Inc., San Diego 52(30) : 302 (1978).
 10. E.D. Wills: Biochemical toxicology a practical approach. IRL Press Limited., Oxford, p. 127 (1987).
 11. E. Niki: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 44 : 227 (1987).
 12. V.M. Samokyszyn and L.J. Marnett: Hydroperoxide-dependent cooxidation of 13-*cis* retinoic acid by prostaglandin H synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 262 : 14119 (1987).
 13. V.M. Samokyszyn and L.J. Marnett: Inhibition of liver microsomal lipid peroxidation by 13-*cis*-retinoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 8 : 491 (1990).

Inhibition of Benzo(a)pyrene-induced Mutagenicity and Lipid Peroxidation by d-Limonene and Cineole

Eun Mee Kang, Do-Jang Kim, Jin-Gon Kim and Ki-Hwa Jung

It has been reported that d-limonene inhibits chemical induced rat mammary cancer by the mechanism of increases in detoxification enzymes such as glutathione-S-transferase and that cineole fails to exhibit significant suppressive effect on chemical induced carcinogenesis. The present study was designed to compare the effects of d-limonene and cineole on the benzo(a)pyrene (BP)-induced mutagenicity, BP metabolism and lipid peroxidation. Modified Ames assay was employed to evaluate the inhibitory effect of d-limonene and cineole on the BP-induced mutagenicity. The number of revertant bearing wells was decreased by 44-77% in the presence of both BP and d-limonene compared with that of BP alone whereas cineole decreased the number of revertant bearing wells by 28-45% at the concentration between 2.5 and 100 μ M and d-limonene suppressed BP metabolism by 16, 54 and 67% at 1, 10 and 100 μ M, respectively, while cineole inhibited the BP metabolism by 16, 26 and 55% at the same concentration. The EC₅₀ values for d-limonene and cineole in inhibiting lipid peroxidation were 2.5 and 10 μ M, respectively, as assayed by thiobarbituric acid method. Thus, the present study showed that d-limonene and cineole have common antimutagenic effects although d-limonene appeared to be more effective than cineole in suppressing mutation and lipid peroxidation. The mechanism may be associated with alteration in the enzyme activity present in the 29 fractions and with inhibition of lipid peroxidation.