

Riboflavin Tetrabutylate 가 약물대사 효소 및 지질 과산화효소에 미치는 영향

延世大學校 醫科大學 藥理學教室

李 香 雨 · 金 源 准 · 洪 思 夷

成均館大學校 藥學大學 衛生化學教室

郭 昌 烈 · 洪 思 澳

=Abstract=

Effect of Riboflavin Tetrabutylate on the Activity of Drug Metabolizing Enzyme and Lipid Peroxidation in Liver Microsomes of Rats

H.W. Lee, W.J. Kim and S.S. Hong

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine

C.Y. Kwack and S.U. Hong

Sung Kyun Kwan University College of Pharmacy

Lipid peroxidation *in vitro* has been identified as a basic deteriorative reaction in cellular mechanism of aging processes, such as air pollution oxidant damage to cell and to the lung, chlorinated hydrocarbon hepatotoxicity.

Many experimental evidences were reported by several investigators that lipid peroxidation could be one of the principle causes for the hepatotoxicity produced by CCl_4 . It is now reasonably established that CCl_4 is activated to a free radical *in vivo*, that lipid peroxidation occurs very quickly in microsomes prepared from damaged livers, that the peroxidation is associated with loss of enzyme activity of microsomes, and that various antioxidants can protect animals against the hepatotoxic effect of CCl_4 .

Recent studies have drawn attention to some other feature of microsomal lipid peroxidation. Incubation of liver microsomes in the presence of NADPH has led to a loss of cytochrome P_{450} . However, the presence of an antioxidant prevented lipid peroxidation and preserved cytochrome P_{450} . Decrease of cytochrome P_{450} in microsomes under *in vitro* incubation can be enhanced by CCl_4 and these changes were parallel to a loss of microsomal polyunsaturated fatty acid and formation of malonaldehyde.

The primary purpose of this experiment was to study the effect of riboflavin tetrabutylate on lipid peroxidation, specially, the relationship between lipid peroxidation and drug metabolizing enzyme system which is located in smooth endoplasmic reticulum as well as the effect of riboflavin tetrabutylate on drug metabolizing enzyme system of animal treated with CCl_4 .

Albino rats were used for experimental animal. In order to induce drug metabolizing enzyme system, phenobarbital was injected intraperitoneally. CCl_4 and riboflavin tetrabutylate were given intraperitoneally as solution in olive oil. Microsomal fraction was isolated from liver of animals and TBA value as well as the activity of drug metabolizing

enzyme were measured in the microsomal fractions.

The results are summarized as following.

1) The secobarbital induced sleeping time of CCl_4 treated rat was about 2 times longer than that of the control group. However, the pretreatment with riboflavin tetrabutylate inhibited completely the lengthened sleeping time due to CCl_4 treatment. Furthermore TBA value was significantly increased in CCl_4 treated rat in comparison to control group but the increase of TBA value was prevented by the pretreatment with riboflavin tetrabutylate. On the other hand, the activity of hepatic drug metabolizing enzyme was decreased in CCl_4 group, however, the pretreatment with riboflavin tetrabutylate also prevented the decrease of the enzyme activity caused by CCl_4 .

2) The effect of riboflavin tetrabutylate on TBA value and the activity of drug metabolizing enzyme *in vitro* was similar to *in vivo* results. Incubation of liver microsome from rat in the presence of CCl_4 , Fe^{++} , or ascorbic acid has led to the marked increase of TBA value, however, the addition of riboflavin tetrabutylate in incubation mixture prevented significantly the increase of TBA value, suggesting the inhibition of lipid peroxidation. In accordance with TBA value, the activity of drug metabolizing enzyme was inhibited in the presence of CCl_4 , Fe^{++} , ascorbic acid but the addition of riboflavin tetrabutylate protected the loss of the enzyme activity in microsome under *in vitro* incubation.

緒 論

脂質의 過酸化現象은 不飽和脂肪의 oxidative deterioration 現象으로서 그 機轉은 아직 明確히 밝혀져 있지 않다,

Horgan¹⁾ 등은 linoleic acid peroxide를 albino rat에 靜脈注射하여 甚한 毒性을 觀察하였고 Lewis 및 Wills²⁾는 이와같은 毒性은 amino acid의 化學的인 變化나 혹은 酵素의 sulfhydryl 基의 酸化破壞에 基因한 것이라고 推測하였다. 한편 Tsen 및 Collier³⁾, Wills 및 Wilkinson⁴⁾은 生成된 過酸化脂質이 erythrocyte 혹은 lysosome의 membrane에 障害를 준다고 報告하였다. Tappel⁵⁾은 生體內에서 脂質의 過酸化現象으로 生成된 free radical intermediate가 生體의 老化現象, 動脈硬化症 및 肝臟障害等과 밀접한 관계가 있을 것이라고 推定하였다. 이와같은 現象은 初期에 free radical intermediate가 細胞內에서 molecular reaction에 影響을 주며 結果的으로는 subcellular membrane에 損傷을 일으키게 되고 나아가서는 細胞에 損傷을 주게 된다고 推測하였다.

1963年 Hochstein 및 Ernster⁶⁾ 등은 NADPH와 ADP存在下에 albino rat의 肝臟으로부터 分離한 microsome 分劃을 incubation한 結果 過酸化脂質이 生成되었다고 처음으로 報告하였다. 또한 이와같은 過

酸化脂質의 生成은 抗酸化劑에 依하여 抑制됨을 觀察하고 이는 microsome 分劃이 ADP의 活性化로 因하여 脂質의 過酸化作用을 促進하기 때문이라고 推測하였다. Schacter⁷⁾, Welton 및 Aust⁸⁾, Reiner⁹⁾ 등은 NADP存在下에 肝臟 microsome 分劃을 incubation한 結果 cytochrome P₄₅₀이 顯著히 減少됨을 觀察하였다. 이와 같은 cytochrome P₄₅₀의 減少는 butylated hydroxytoluene(BHT)과 같은 抗酸化劑를 添加하면 防止될 수 있고 나아가서는 脂質의 過酸化現象도 抑制할 수 있었다고 報告하였다. 또한 이 實驗으로 CCl_4 의 影響을 檢索한 結果 CCl_4 는 cytochrome P₄₅₀이 더욱 減少되어 갔으며 cytochrome P₄₅₀의 減少와 批例하여 microsome 分劃內의 不飽和脂肪酸量도 減少됨을 觀察하였다. 이는 脂質의 過酸化로 因하여 cytochrome P₄₅₀이 減少한 것이라고 主張하였다,

CCl_4 가 肝臟에 미치는 毒性에 關하여서는 이미 잘 알려져 있으나 그 毒性의 機轉에 對해서는 아직도 論難의 對象이 되고있다. Recknagel^{10,11)} 등은 CCl_4 가 不飽和脂肪의 過酸化現象을 誘發하며 이는 CCl_4 의 CCl_3 -Cl 結合에서 分離된 CCl_3 와 같은 free radical intermediate가 形成되어 肝臟 endoplasmic reticulum에 存在하는 酵素를 破壞한다고 報告하였다. 最近 Slater 및 Sawyer¹²⁾은 이와 같은 CCl_3 free radical intermediate의 形成은 microsome에 存在하는 NADPH-dependent electron transport system에 依하

여 영향을 받는다고 주장하고 있으나 아직 명확한 실험의 근거는提示되고 있지 않다, 그러나 CCl_4 의 肝臟에 대한 毒性은 CCl_3 free radical intermediate가 electron transport system에 미치는 作用일 것이며 그 構成成分인 cytochrome P_{450} , cytochrome c 및 NADPH-cytochrome c reductase 등이 關與되고 있음을 推測할 수 있다,

藥物代謝에 重要な 役割을 하는 drug metabolizing enzyme system은 細胞內의 smooth endoplasmic reticulum에 存在하며 構成要素는 NADPH, NADPH-cytochrome P_{450} reductase 및 cytochrome P_{450} 등이 包含되고 있는 복잡한 酵素이며 phenobarbital에 依하여 이 효소계의 de novo 합성에 依하여 作用이 亢進됨이 잘 알려져 있다. Wills¹³⁾는 drug metabolizing enzyme system의 一種인 hydroxylating system이 脂質의 過酸化를 일으키는 過程에서 그 一部는 아마도 同一한 system에 屬할 것이라고 推測하였다. Orrenius¹⁴⁾ 등은 aminopyrine이나 codeine 등이 microsome 分割內에서 일어나는 脂質의 過酸化가 강력히 抑制됨을 觀察하고 peroxidation system과 drug metabolizing enzyme system과의 相互關聯性을 暗示하였다,

著者は 最近 抗酸化 효과가 있으며 臨床에서 많이 使用되고 있는 riboflavin tetrabutylate(B_2 -but)를 使用하여 不飽和脂肪의 過酸化現象과 drug metabolizing enzyme system과의 相互關聯性 및 CCl_4 投與로 因하여 惹起된 albino rat 肝臟 microsome內 脂質의 過酸化現象과 aminopyrine demethylase의 活性度 변화에 미치는 B_2 -but 효과를 測定하여 意義있는 知見을 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 實驗方法

1) 實驗動物 및 實驗群

(1) 실험동물 :

實驗動物로는 몸무게 200 g 內外의 albino rat를 使用하여 1週日以上 飼育室에서 環境에 適應시킨 다음 實驗에 使用하였다,

(2) 실험군 및 실험방법 :

1) Riboflavin tetrabutylate가 secobarbital에 基因한 睡眠時間에 미치는 影響

A. 對照群 : olive oil 0.5 ml를 1日 1回씩 3日間 腹腔內에 投與하였다.

B. Phenobarbital 處置群 : phenobarbital 50 mg/kg와 olive oil에 녹인 riboflavin tetrabutylate 10 mg/animal을 1日 1回씩 3日間 腹腔內에 併用投與한

다음 secobarbital 30 mg/kg을 腹腔內에 投與하여 睡眠時間을 測定하였다.

C. CCl_4 處置群 : 20 v/v% CCl_4 의 olive oil 溶液 0.1 ml를 腹腔內에 1日 2回씩 2日間을, 또한 olive oil에 녹인 riboflavin tetrabutylate 10 mg/animal을 1日 1回씩 3日間 腹腔內에 投與하되 2日間은 1회에 限하여 併用投與한 다음 secobarbital 30 mg/kg을 腹腔內에 投與하여 睡眠時間을 測定하였다.

2) Riboflavin tetrabutylate가 thiobarbituric acid (TBA)值 및 藥物代謝酵素에 미치는 影響

A. CCl_4 前處置後의 riboflavin tetrabutylate 投與群 : 20 v/v% CCl_4 의 olive oil 液 0.2 ml를 1日 1回씩 2日間 腹腔內에 投與한 다음 riboflavin tetrabutylate 10 mg/animal을 1日 1回씩 2日間 및 5日間 投與하고 肝臟 microsome 分割內 TBA 值 및 藥物代謝酵素의 活性度 變化를 測定하였다.

B. Riboflavin tetrabutylate 前處置後의 CCl_4 投與群 : riboflavin tetrabutylate 10 mg/animal을 1日 2回씩 2日間 投與한 다음 20v/v% CCl_4 의 olive oil 0.2 ml를 腹腔內에 投與하고 肝臟 microsome 分割內 TBA 值 및 藥物代謝酵素의 活性度を 測定하였다.

C. Phenobarbital 前處置群 : phenobarbital 50 mg/kg을 1日 1回씩 5日間 腹腔內에 投與하여 藥物代謝酵素의 活性도를 亢進시킨 다음 CCl_4 의 肝臟毒性에 對한 riboflavin tetrabutylate의 效果를 檢定하였다.

3) In vitro에서 riboflavin tetrabutylate가 TBA 值 및 藥物代謝酵素에 미치는 影響

A. 對照群 : 對照群은 1 mM aminopyrine 0.5 ml, 0.8 M phosphate buffer 0.2 ml, cofactor 混液 1 ml (0.33 mM NADP 0.3ml, 0.8 mM glucose-6-phosphate 0.3 ml, 15 μ M $MgCl_2$ 0.3 ml 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.114 unit) 및 microsome 分割 0.2 ml (0.3 mg protein)를 基本的으로 含有한 溶液內에 20% propylene glycol을 添加하였다. 實驗條件에 따라 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 및 $CoSO_4$ 는 各各 0.04 mM 및 0.5 mM의 濃도가 되도록, ascorbic acid 및 EDTA는 各各 0.1 mM의 濃도가 되도록 添加한 다음 30分間 incubation 하고 이 incubation mixture를 各各 0.5 ml씩 取하여 TBA 值와 藥物代謝酵素의 活性度を 測定하였다.

B. Riboflavin tetrabutylate 添加群 : riboflavin tetrabutylate를 $4 \times 10^{-5}M$ 의 濃度로 20% propylene glycol에 溶解시킨 다음 incubation mixture에 propylene glycol 代身 添加하고 incubation 하여 對照群과 同一하게 檢定하였다.

Aminopyrine demethylase 活性度の測定은 glucose -6-phosphate 1.69 mg, ATP 1.22 mg, NADP 0.4 mg, 1M KCl 0.2 ml, 0.1 M MgCl₂ 0.1 ml 및 0.1 μ M semicarbazide HCl 0.2 ml 를 含有한 incubation mixture 를 使用하였다. 酵素原으로는 microsome 分劃(15~20 mg protein) 0.5 ml 를 使用하였다. 이 液에 基質로 10mM aminopyrine 2.0 ml 를 加한 다음 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 를 넣어 全量을 6.0 ml 로 하고 37°C 에서 約 30分間 酵素를 注入시키면서 duBroff metabolic shaking incubator 에서 反應시켰다. 이 反應에서 N-demethylation 으로 生成되는 formaldehyde 를 Cochin¹⁵⁾ 의 Nash 法으로 測定하였다.

過酸化脂質의 測定은 Microsome 分劃內의 過酸化脂質의 測定은 microsome 分劃(2~3 mg protein) 0.1 ml 에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml 를 넣고 溶解시킨 다음 20% acetic acid buffer (pH 3.5) 1.5 ml 를 넣어 잘 攪拌하고 0.8% TBA 試液 1.5 ml 를 넣은 다음 蒸溜水로 4.0 ml 가 되도록 하였다. 이 液을 95°C 에서 約 1時間 加熱한 다음 蒸溜水 1.0 ml 및 n-butanol-pyridine 混液(15:1) 5.0 ml 로 抽出하여 532 m μ 에서 吸光度를 測定¹⁶⁾하였다. 標準液으로는 tetramethoxy propane 5 n mole 을 使用하였다.

蛋白質의 測定方法은 Lowrey¹⁷⁾의 方法에 準하여 測定하였다.

III. 實驗 結果

1) 백서의 睡眠時間에 미치는 影響

第 1 表에서 보는바와 같이 phenobarbital 50 mg/kg 을 1日 1회씩 3日間 腹腔內에 投與한 群은 secobarbital 을 30 mg/kg 投與하여도 全혀 睡眠現象을 보지 못하였으나 CCl₄ 投與群에서는 正常群의 睡眠時間 70分에 比하여 151分으로 約 2倍以上 延長되었다. 한편 riboflavin tetrabutylate 投與群은 正常群에 比하여 睡眠時間에 別差異를 보지 못하였으나 CCl₄와 riboflavin tetrabutylate 를 併用投與한 群에서는 secobarbital 에 依한 睡眠時間이 75分으로 CCl₄ 投與群에서 延長된 睡眠時間이 完全히 抑制되었음을 볼 수 있었다.

CCl₄ 投與한 다음 約 7日後에 riboflavin tetrabutylate 를 投與한 群과 投與하지 않은 群의 睡眠時間을 比較한 結果 第 2 表에서 보는 바와 같다. 兩群은 모두 正常群에 比하여 secobarbital 投與로 因한 睡眠時間의 延長을 볼 수 없었고 오히려 若干 短縮되었음을 보여 주었다. 특히 riboflavin tetrabutylate 投與群에서 보

Table 1. Effect of riboflavin tetrabutylate (B₂-but) on the secobarbital induced sleeping time of rat pretreated with CCl₄ or phenobarbital

Pretreatment [Ⓐ]	Sleeping time (min) [Ⓑ]
None	70 \pm 3.0
Phenobarbital	No sleeping
CCl ₄	151 \pm 2.2***
Riboflavin tetrabutylate (B ₂ -but)	77 \pm 6.5
Phenobarbital+B ₂ -but	No sleeping
CCl ₄ +B ₂ -but	75 \pm 7.0†††

Ⓐ Rats were pretreated intraperitoneally with a daily doses of phenobarbital (50 mg/kg) or CCl₄ (0.1 ml of 20 v/v% solution in olive oil) for 3 days or one day, respectively. Riboflavin tetrabutylate (10 mg/animal) was injected intraperitoneally for 3 days.

Ⓑ Sleeping times were measured by using a single challenging dose of secobarbital (30 mg/kg) intraperitoneally.

***; P<0.001 compared with none group

†††; P<0.001 compared with CCl₄ group

다 睡眠時間이 短縮되어 적어도 CCl₄ 投與한 다음 7日後에는 CCl₄가 肝臟에 미치는 毒性이 거의 回復됨을 알 수 있었다.

2) Riboflavin tetrabutylate 가 CCl₄에 依한 脂質의 過酸化現象 및 藥物代謝酵素에 미치는 影響

(1) Riboflavin tetrabutylate 가 CCl₄ 毒性에 미치는 影響 :

第 2 表에서 보는 바와 같이 CCl₄ 를 投與한 다음 7日後에는 albino rat 의 肝臟 microsome 分劃內에 있어서 TBA 値가 正常群에 比하여 若干 낮은 傾向이 있었다. CCl₄로 2日間 前處置한 다음 riboflavin tetrabutylate 를 投與한 群에서는 CCl₄만을 投與한 群에 比하여 TBA 値가 더욱 낮았다. 한편 藥物代謝酵素의 一種인 aminopyrine demethylase 의 活性度の 變化는 CCl₄로 2日間 前處置한 다음 riboflavin tetrabutylate 投與群에서는 正常群에 比하여 aminopyrine demethylase 의 活性도에 거의 差異를 보여 주지 않았으나 CCl₄만을 投與한 群에서는 若干 減少되었다. CCl₄만을 投與한 群에서는 7日後에도 아직 microsome 分劃內에서 aminopyrine demethylase 의 活性도가 完全히 回復되지 않음을 보여주었다.

Table 2. Effect of riboflavin tetrabutylate on TBA value and the activity of aminopyrine demethylase in rats given CCl₄

Treatment [Ⓐ]	Sleeping time (min)	TBA Value (n mole/mg protein)	Aminopyrine demethylase (HCHO μ mole/mg protein)
None	70±3.2	9.25±0.832	0.18±0.014
CCl ₄ alone	60±0.7*	8.54±0.179	0.14±0.006*
CCl ₄ +B ₂ -but	54±1.9†	5.59±0.148††	0.20±0.019

Ⓐ Rats were pretreated with 2 daily doses of CCl₄ (0.2 ml of 20 v/v% solution in olive oil) intraperitoneally, then with riboflavin tetrabutylate (10 mg/animal/day) for 5 days.

*; P<0.05 compared with none group

†; P<0.05, ††; P<0.01 compared with CCl₄ group

Table 3. Effect of pretreated riboflavin tetrabutylate on TBA value and the activity of aminopyrine demethylase in rat given CCl₄

Treatment [Ⓐ]	TBA value (n mole/mg protein)	Aminopyrine demethylase (HCHO μ mole/mg protein)
None	7.02±0.435	0.16±0.037
CCl ₄ alone	10.51±0.300**	0.08±0.009***
B ₂ -but+ CCl ₄	6.62±0.495††	0.13±0.020††

Ⓐ Riboflavin tetrabutylate (10 mg/animal) was given intraperitoneally twice a day for 2 days and CCl₄ (0.2 ml of 20 v/v% solution in olive oil) was administered intraperitoneally 3 hr before sacrificed.

; P<0.01, *; P<0.001 compared with none group

††; P<0.01 compared with CCl₄ group

2) CCl₄ 독성에 미치는 Riboflavin tetrabutylate 前處置 효과 :

Riboflavin tetrabutylate 로 前處置한 albino rat 에 미치는 CCl₄ 의 影響을 觀察하였다. Riboflavin tetrabutylate 를 olive oil 에 懸濁시켜 albino rat 에 (10 mg/animal) 1日 2回씩 2日間 腹腔內에 投與하고 屠殺하기 3時間前에 CCl₄ 를 投與한 結果는 第3表에서 보는 바와 같다. CCl₄ 만을 投與한 對照群은 TBA 値가 10.51 nmole 로서 正常群의 7.02 nmole 에 比하여 상당히 增加하였다. Aminopyrine demethylase 의 活性度도 正常群의 0.16 μmole/mg protein 에 比하여 CCl₄ 만을 投與한 群은 0.08 μmole/mg protein 로 顯著히 減少되었다. 그러나 riboflavin tetrabutylate 로 前處置한 群은 TBA 値가 6.62 nmole 로서 CCl₄ 만을 投與한 群에 比하여 顯著히 낮아 TBA 値의 上昇을 상당히 抑制하였다. 또한 aminopyrine demethylase 의 活性度는 0.13 μmole 로 CCl₄ 에 依한 活性度の 低下를 意義 있게 抑制함을 볼 수 있다.

3) Riboflavin tetrabutylate 가 phenobarbital 前

處置群에 미치는 影響

Phenobarbital (50 mg/kg) 을 씩서 腹腔內에 1日 2回씩 5日間 投與하여 藥物代謝酵素를 亢進시킨 다음 CCl₄ 의 肝臟毒성에 미치는 riboflavin tetrabutylate 效果를 檢定하였다. 第4表에서 보는 바와 같이 phenobarbital 을 投與한 對照群은 正常群에 比하여 TBA 値 및 aminopyrine demethylase 의 活性度가 顯著히 上昇하였다. 한편 phenobarbital 을 投與한 다음 CCl₄ 를 投與한 群은 TBA 値가 顯著히 上昇하였으나 aminopyrine demethylase 의 活性度는 若干 減少하였다. CCl₄ 投與 3時間前에 riboflavin tetrabutylate 로 1回 前處置한 群에서는 TBA 値나 aminopyrine demethylase 의 活性度는 CCl₄ 投與群에 比하여 別變化가 없으며 CCl₄ 의 毒性을 거의 抑制하지 못하였다.

3) Riboflavin tetrabutylate 가 in vitro 에서 脂質의 過酸化現象 및 藥物代謝酵素에 미치는 影響

In vitro 에서 riboflavin tetrabutylate 존재하에 CCl₄, Fe⁺⁺, Co⁺⁺, ascorbic acid 및 EDTA 를 添加한

Table 4. The changes of TBA value and the activity of aminopyrine demethylase in rat pretreated with phenobarbital and riboflavin tetrabutylate

Group [Ⓐ]	Treatment [Ⓐ]	TBA value (n mole/mg protein)	Aminopyrine demethylase (HCHO μ mole/mg protein)
Control	None	8.48 \pm 0.273	0.20 \pm 0.083
Phenobarbital	None	13.90 \pm 0.819**	0.45 \pm 0.065***
Phenobarbital	CCl ₄	14.52 \pm 0.630***	0.12 \pm 0.021**
Phenobarbital	B ₂ -but+CCl ₄	14.16 \pm 0.461	0.14 \pm 0.012†

[Ⓐ] Phenobarbital(50 mg/kg/day) was injected intraperitoneally for 5 days. Rats were first pretreated with riboflavin tetrabutylate(10 mg/animal) 3 hr before treatment with CCl₄. Then animal was sacrificed 3 hr after CCl₄ treatment.

*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001 compared with control group

†; P<0.05 compared with CCl₄ group

Table 5. Effects of various substances *in vitro* on the activity of aminopyrine demethylase and TBA value in rat liver microsome in the presence or absence of riboflavin tetrabutylate

Additions	TBA value(n mole/mg protein)		Aminopyrine demethylase (HCHO μ mole/mg protein)	
	None	B ₂ -but(4 \times 10 ⁻⁵ M) [Ⓐ]	None	B ₂ -but(4 \times 10 ⁻⁵ M)
Control	4.05 \pm 0.010	3.94 \pm 0.076	0.65 \pm 0.001	0.94 \pm 0.033
CCl ₄ (40mM)	7.81 \pm 0.470**	5.91 \pm 0.246*	0.37 \pm 0.016***	0.71 \pm 0.069***
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O(40 μ M)	46.89 \pm 0.448***	27.99 \pm 1.395***	0.49 \pm 0.035**	0.90 \pm 0.041**
CoSO ₄ (0.5mM)	5.86 \pm 0.152*	4.93 \pm 0.226	0.83 \pm 0.082**	0.97 \pm 0.064
Ascorbic acid(0.1mM)	32.78 \pm 0.854***	23.33 \pm 0.774***	0.57 \pm 0.064*	0.92 \pm 0.056**
ECTA(0.1mM)	4.73 \pm 0.112*	3.65 \pm 0.112	0.75 \pm 0.081*	1.08 \pm 0.073

[Ⓐ] Riboflavin tetrabutylate was dissolved in 20% propylene glycol and other experimental conditions were described in method.

*; ¹P<0.05, **; P<0.01 ***; P<0.001 compared with control group

때 일어나는 TBA 値 및 aminopyrine demethylase 의 活性度變化는 第 5 表에서 보는바와 같다. *In vitro* 에서도 CCl₄를 添加한 것은 TBA 値가 顯著히 增加하였다. Fe⁺⁺ 및 ascorbic acid를 添加한 것은 各各 約 12倍 및 8倍로 增加하였으나 Co⁺⁺와 EDTA를 添加한 것은 別變化를 보지 못하였다. 그러나 riboflavin tetrabutylate를 添加한 것은 CCl₄에 依한 TBA 値의 增加를 意義있게 抑制하였다. 특히 Fe⁺⁺ 및 ascorbic acid를 添加하여 增加한 TBA 値를 各各 40% 및 30% 정도로 顯著히 抑制되었다. Aminopyrine demethylase 의 活性度變化는 CCl₄를 添加한 것은 活性도가 顯著히 低下되었으나 riboflavin tetrabutylate를 添加한 것은 活性도의 低下가 抑制되었다. 또한 Fe⁺⁺ 및 ascorbic acid를 添加한 것에서도 CCl₄만을 添加한 것에 比하여 riboflavin tetrabutylate를 添加한 것이 意義있게 aminopyrine demethylase 活性도를 低下하였다.

Co⁺⁺ 및 EDTA를 添加한 것은 CCl₄를 添加한 것에 比하여 若干增加하는 傾向性이 있었고 riboflavin tetrabutylate를 添加한 것은 添加하지 않은 것에 比하여 若干 上昇되는 傾向을 보여주고 있다.

考 察

May¹⁸⁾ 및 Niehaus¹⁹⁾ 등은 肝臟의 microsome 分割에서 脂肪의 過酸化現象은 microsome 分割의 主構成成分인 phospholipid가 分解하여 일어난다고 報告하였으며 Wills¹³⁾, Högborg²⁰⁾ 및 共同研究者들은 microsome에 含有하고 있는 酵素의 活性도가 脂質의 過酸化現象에 依하여 影響을 받는다고 報告하였다. Orrenius¹⁴⁾ 등은 肝臟의 microsome에 含有하고 있는 藥物代謝酵素의 一種인 aminopyrine demethylase 및 codeine demethylase 의 活性도는 脂質의 過酸化現象

과 密接한 關係가 있어 microsome 分割에 codeine 및 aminopyrine 을 基質로 하여 incubation 한 것과 microsome 分割만을 incubation 한 것과는 比較할때 脂質의 過酸化現象이 顯著히 抑制되었다고 報告하였다.

Wills²¹⁾는 ascorbic acid 또는 NADP 등으로 microsome 分割을 處置하여 脂質의 過酸化現象을 增加시킨 結果 aminopyrine demethylase 의 活性도는 反對로 急激히 低下된다고 報告하였다. 이와 같은 結果는 脂質의 過酸化現象에 依하여 microsome 分割이 破壞됨에 따라 酵素의 活性도가 低下되는 것이라고 主張하였다.

本 實驗에서는 抗酸化作用이 있는 riboflavin tetrabutylate 가 CCl₄에 依하여 肝臟內에서 일어나는 脂質의 過酸化現象 및 藥物代謝酵素에 미치는 影響을 調査하였다.

Phenobarbital 또는 CCl₄로 前處置한 群에서 secobarbital로 因하여 일어나는 睡眠時間을 riboflavin tetrabutylate 가 正常群의 睡眠時間으로 回復시켜주는 效果가 있는 것으로 보아 生體內에서 過酸化脂質의 生成을 抑制할 수 있으리라는 可能性이 있음을 알 수 있었다. 즉 phenobarbital로 前處置하여 藥物代謝酵素를 充進시킨 動物에서는 secobarbital을 投與하여도 全혀 睡眠作用이 일어나지 않았으나 CCl₄로 前處置한 群은 正常群의 睡眠時間 70분에 比하여 151분으로 約 2배 以上이나 睡眠時間이 延長되었다. 그러나 CCl₄와 riboflavin tetrabutylate 를 併用投與하였을 때는 睡眠時間이 75분으로 正常群과 거의 同一한 睡眠時間을 보여주었다. 이는 CCl₄의 肝臟 microsome 에 對한 毒性이 riboflavin tetrabutylate 에 依하여 防止될 수 있음을 暗示하는 것으로 思料된다. CCl₄만을 投與한 群도 投與한 다음 7日後의 睡眠時間은 第 2表에서 보는 바와 같이 睡眠時間이 延長되지 않았으며 riboflavin tetrabutylate 를 併用投與한 群에서도 別變化를 보이지 않았다. 이것은 CCl₄를 投與한 다음 7日後에는 毒性이 거의 解毒이 되어 正常으로 回復된 것으로 생각된다.

CCl₄의 肝臟에 對한 毒性은 오래전 부터 報告되어 왔으나 生化學的인 機轉은 아직 確실히 究明되어 있지 않다. 그러나 近來에 와서 Castro²²⁾, Villarreal²³⁾, Cawthorne²⁴⁾ Gillette,²⁵⁾ Mahling³⁷⁾ 및 共同研究者들은 CCl₄가 生體內 代謝로 因하여 CCl₃와 같은 free radical intermediate를 形成하고 이 free radical intermediate가 細胞內의 蛋白質 혹은 脂質에 covalent bonding으로 結合하여 肝臟에 毒性을 미치게 하며 이

現象은 結果적으로 microsome 分割에서 脂質의 過酸化現象을 일으킨다고 主張하였다. 그러나 Recknagel^{10,11)} 등은 CCl₃의 free radical intermediate에 依하여 肝臟細胞內의 endoplasmic reticulum에서 脂質의 過酸化現象이 먼저 일어나며 이로 因하여 細胞構造 및 作用에 非正常狀態가 誘發되며 結果적으로 毒性을 나타내는 것이라 主張하였다. 本 實驗에서는 CCl₄의 肝臟에 미치는 毒性에 對한 生化學的 機轉을 說明할 수는 없으나 CCl₄와 riboflavin tetrabutylate 를 albino rat에 併用投與할때 睡眠時間이 正常으로 維持된다는 것은 아마도 CCl₄의 肝臟毒性은 肝臟細胞內 endoplasmic reticulum이 脂質의 過酸化現象과 깊은 關係가 있음을 示唆하는 것이라고 생각된다. Villarreal²³⁾ 등은 CCl₄를 投與한 다음 3時間後에 albino rat의 肝臟內에서 TBA 値가 約 2배로 增加하였음을 보았으며, Glende²⁶⁾, Masuda²⁷⁾ 등도 CCl₄로 因하여 肝臟 microsome 內에서 TBA 値가 增加됨을 觀察하였다. 그러나 aminopyrine demethylase 의 活性도는 이에 反하여 오히려 低下되었다고 報告하였다.

本 實驗에서도 屠殺 3時間前에 CCl₄만을 投與한 群에서는 肝臟內의 TBA 値는 正常群에 比하여 約 50%나 增加하였으나 2日前부터 riboflavin tetrabutylate 로 前處置한 群에서는 CCl₄에 依한 TBA 値의 增加가 抑制되었음을 볼 수 있었다.

한편 aminopyrine demethylase 의 活性도는 CCl₄ 處置群은 正常群에 比하여 約 1/2로 減少되었으나, riboflavin tetrabutylate 를 前處置한 群에서는 活性도의 低下가 防止되었음을 알 수 있었다. 이 結果는 위에서 言及한 바와 같이 CCl₄로 因한 睡眠時間의 延長이 riboflavin tetrabutylate 로 處置하여 防止된 結果와 一致하는 結果로 思料된다. 따라서 CCl₄에 依한 脂質의 過酸化現象과 藥物代謝酵素와는 相互關聯성이 있음을 暗示해 주고있다.

Sorrell²⁸⁾, Tuma²⁹⁾ 등은 phenobarbital을 投與한 albino rat의 肝臟內에 triglyceride가 蓄積됨을 보았으며 Hahn^{30,31)}은 phenobarbital이 albino rat의 肝臟內에서 脂質의 過酸化現象을 促進시켜 주고 있음을 觀察하였다. 그리고 이와 같은 現象은 NADPH-dependent enzyme에 依한 作用이라고 主張하고 있다. Conney³²⁾는 phenobarbital로 處置한 結果 microsome 分割內에 cytochrome c reductase의 活性도가 특히 增加함을 보았으나 이는 Hahn³¹⁾ 등의 報告와 一致하는 結果라고 思料된다. 第 4表에서 보는 바와같이 phenobarbital을 5日間 投與한 albino rat에서는 TBA 値

가 顯著히 增加되었고 aminopyrine demethylase의 活性度도 2倍以上 增加하였다. 이는 Hahn³¹⁾ 등의 報告와 一致하지만 이와 같은 結果가 NADPH-dependent enzyme에 依한 것인지는 本 實驗만으로는 아직 推測하기 어렵다고 思料된다. 한편 riboflavin tetrabutylate로 1회 前處置하고 屠殺하기 3時間前에 CCl₄로 處置한 群에서 riboflavin tetrabutylate 効果는 phenobarbital로 增加된 TBA 值에는 뚜렷한 影響은 미치지 못하였으나 aminopyrine demethylase의 活性度에는 若干의 影響은 있는 것으로 思料된다. 그러나 CCl₄로 먼저 處置한 다음 2회 riboflavin tetrabutylate를 投與한 群에서는 TBA 值 및 aminopyrine demethylase 活性度에 別影響을 미치지 못하였다.

Kamatagi 및 Kitagawa³²⁾는 脂質의 過酸化現象과 藥物代謝酵素와의 關係를 究明하기 위하여 *in vitro*에서 albino rat의 肝臟 microsome 分割에 Fe⁺⁺를 添加하여 incubation 할때 TBA 值은 顯著히 上昇하고, aminopyrine demethylase 및 ethylmorphine demethylase의 活性度는 오히려 顯著히 低下하는 現象을 觀察하였다. 이 現象은 incubation mixture에 EDTA를 添加하여 주면 防止할 수 있었다고 報告하였다. Matsuoka³³⁾ 및 Tahara³⁴⁾ 등은 riboflavin tetrabutylate를 投與한 結果 CCl₄에 基因하여 일어나는 microsome 內의 glucose-6-phosphate 및 cytochrome P₄₅₀의 減少가 防止되었다고 報告하였다. 本 *in vitro* 實驗에서도 incubation mixture에 CCl₄를 添加한 結果 TBA 值이 約 2배로 增加하는 脂質의 過酸化現象을 觀察하였다. 이와 같은 增加現象은 riboflavin tetrabutylate를 添加하였을때 意義있는 抑制現象을 보여 주었으며, *in vivo* 實驗結果와 一致하였다. 즉 *in vivo*에서도 riboflavin tetrabutylate가 脂質의 過酸化를 防止하는 效果를 볼 수 있었다. 또한 Fe⁺⁺ 添加로 因하여 TBA 值이 約 12배 以上 增加하였으나 riboflavin tetrabutylate를 添加하니 顯著하게 抑制되는 效果를 나타내었다. Ascorbic acid의 添加에 依한 TBA 值의 變化는 Fe⁺⁺ 添加에 依한 變化보다는 微弱하였으며 riboflavin tetrabutylate의 効果는 Fe⁺⁺의 경우 보다는 顯著히 낮았다. 따라서 riboflavin tetrabutylate가 脂質의 過酸化現象을 抑制하는 效果는 非酵素的으로 進行되는 脂質의 過酸化現象에 比하여 肝臟 microsome 內에 含有하는 NADPH-dependent enzyme을 經由하여 일어나는 脂質의 過酸化現象에 더욱 큰 效果를 나타내는 것으로 思料된다. 한편 riboflavin tetrabutylate가 CCl₄ 및 Fe⁺⁺에 依하여

aminopyrine demethylase의 活性度가 低下되는 것을 거의 完全히 抑制한 結果는 TBA 值의 變化와 一致하는 傾向을 보여주고 있다. Wills³⁵⁾는 脂質의 過酸化現象에 關係하는 system이나 藥物代謝에 關與하는 system이 一部는 아마도 同一한 system을 經由한 것이라고 推測하였다. 本 實驗의 結果에서도 Wills³⁵⁾의 主張과 一致하는 것으로 思料되며 적어도 一部는 上記 두 現象이 同一한 system을 經由하여 脂質의 過酸化 및 藥物代謝가 이루어지는 것으로 思料된다.

結 論

Riboflavin tetrabutylate가 CCl₄로 因한 albino rat의 肝臟內 脂質의 過酸化現象과 藥物代謝酵素에 미치는 影響을 追究하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Secobarbital 投與에 依한 睡眠時間은 CCl₄로 處置한 群에서는 正常群에 比하여 約 2倍以上의 延長을 가져 왔으나 riboflavin tetrabutylate와 併用投與로 이와 같은 睡眠時間 延長이 完全히 防止되었다.

2. CCl₄의 急性毒性으로 因하여 脂質의 過酸化現象은 顯著하게 增加하는 反面 藥物代謝酵素의 活性度는 顯著하게 低下되었다. 그러나 이와 같은 毒性은 riboflavin tetrabutylate로서 거의 完全히 防止되었다.

3. Phenobarbital로서 藥物代謝酵素를 充進시킨 群에서는 脂質의 過酸化現象 및 藥物代謝酵素의 活性度가 顯著하게 增加되었으며 이 實驗에서의 CCl₄ 毒性은 riboflavin tetrabutylate로서 微弱하게 抑制되었다.

4. *In vitro*에서의 riboflavin tetrabutylate의 效果를 調査한 結果 CCl₄, Fe⁺⁺ 및 ascorbic acid의 添加에 依하여 顯著한 脂質의 過酸化現象의 增加와 藥物代謝酵素의 活性度 低下를 가져왔으나 riboflavin tetrabutylate의 添加로 이와 같은 現象이 意義있게 防止되었다.

參 考 文 獻

- 1) Horgan, V.J., Philpot, J. St L., Porter, W.W. and Roodyn, D.B.: *Biochem. J.*, 67:551, 1957.
- 2) Lewis, S.E. and Wills, E.D.: *Biochem. Pharmacol.*, 11:901, 1962.
- 3) Tsem, C.C. and Collien, H.B.: *Canad. J. Biochem. Phys.*, 38:957, 1960.
- 4) Wills, E.D. and Wilkinson, A.E.: *Biochem.*

- J.*, 99:657, 1965.
- 5) Tappel, A.L.: *Fed. Proc.* 32:1870, 1973.
 - 6) Hochstein, P. and Ernster, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12:388, 1963.
 - 7) Schacter, B.A., Marver, H.S. and Meyer, U. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 279:221, 1972.
 - 8) Welton, A.F. and Aust, S.D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49:661, 1972.
 - 9) Reiner, O., Athanassopoulos, S., Hellier, K. H., Murray, R.E. and Uehleke, H.: *Arch. Toxicol.*, 29:219, 1972.
 - 10) Recknagel, R.O.: *Pharmacol. Rev.*, 19:145, 1967.
 - 11) Recknagel, R.O. and Glende, E.A.: *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 2:263, 1973.
 - 12) Slater, T.F. and Sawyer, B.C.: *Biochem. J.*, 123:805, 1971.
 - 13) Wills, E.D.: *Biochem. J.*, 123:983, 1971.
 - 14) Orrenius, S., Dallner, G. and Ernster, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14:329, 1964.
 - 15) Cochin, J. and Axelrod, J.: *J. Pharmacol. Exp.*, 125:105, 1959.
 - 16) 大右誠子: *最新醫學*, 33:660, 1978.
 - 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
 - 18) May, H.E. and McCay, P.B.: *J. Biol. Chem.*, 243:2288, 1968.
 - 19) Niehaus, W.G. and Samuelson, B.: *Eur. J. Biochem.* 6:126, 1968.
 - 20) Högberg, J., Bergstrand, A. and Jakobsson, S.V.: *Eur. J. Biochem.* 37:51, 1973.
 - 21) Wills, E.D.: *Biochem., Pharmacol.* 21:239, 1972.
 - 22) Castro, J.A. and Diaz, M.I.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23:541, 1972.
 - 23) Villarruel, M.C., Toranzo, E.G.D. and Castro, J.A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41:337, 1977.
 - 24) Cawthorpe, M. A., Buyan, J., Sennitt, M.V. and Gree, J.: *Br. J. Nutr.*, 24:357, 1970.
 - 25) Gillette, J.R., Mitchell, J.R. and Brodie, B.B.: *Ann. Rev. Pharm.*, 14:271, 1974.
 - 26) Glende, E.A., Hruszkewycz, A.M. and Recknagel, R.O.: *Biochem. Pharmacol.*, 25:2163, 1976.
 - 27) Masuba, Y. and Murano, T.: *Biochem. Pharmacol.*, 27:1983, 1978.
 - 28) Sorrell, M.F., Tuma, D.J., Barak, A.J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143:839, 1977.
 - 29) Tuma, D.J., Sorrell, M.F. and Barak, A.J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146:953, 1974.
 - 30) Hahn, H.K., Tuma, D.J. and Barak, A.J.: *Biochem. Pharmacol.*, 27:769, 1976.
 - 31) Hahn, H.K., Barak, A.J., Tuma, D.J. and Sorrell, M.F.: *Biochem. Pharmacol.*, 26:164, 1977.
 - 32) Conney, A.H.: *Pharmacol. Rev.*, 19:317, 1967.
 - 33) Kamataki, T. and Kitagawa, H.: *Biochem. Pharmacol.*, 22:3199, 1973.
 - 34) Matsuoka, S., Tahara, K. and Ohama, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 20:333, 1974.
 - 35) Tahara, K., Matsuoka, S. and Ohama, H.: *Nutr. Sci. Vitaminol.*, 20:81, 1974.
 - 36) Wills, E.D.: *Biochem. J.*, 113:331, 1969.
 - 37) Mahling, H.H., Eichelbaum, F.M., Soul, W., Sipes, I.G., Brown, E.A.B. and Gillett, J.: *Biochem. Pharmacol.*, 23:1479, 1974.