

## 비타민 A 및 B<sub>2</sub> 誘導體의 Aminopyrine Demethylase 活性도에 대한 影響

李 香 雨

成均館大學校 藥學大學

(Received October 13, 1983)

Hyang Woo Lee

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Korea

### Effect of Vitamin A and B<sub>2</sub> Derivatives on Aminopyrine Demethylase Activity

**Abstract:** Drug-metabolizing system which has the important role in drug metabolism is localized in smooth endoplasmic reticulum of hepatocytes and is composed of NADPH, NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase, cytochrome P<sub>450</sub> and others. It is well known that the enzyme system is induced by phenobarbital and methylcholanthrene. Lipid peroxidation is reaction of oxidative deterioration of polyunsaturated lipids. Formation of lipid peroxides in liver microsome has been found to produce degradation of phospholipid, which are major components of microsomal membrane. The relationship between the formation of lipid oxides and the activities of drug-metabolizing enzyme in the liver of rats was reported by several investigators. In this study the effect of riboflavin tetrabutylate, an antioxidant on lipid peroxidation, specially the relationship between lipid peroxidation and drug-metabolizing enzyme system was investigated. In addition the effect of vitamin A derivatives, such as retinoic acid and retinoid on the enzyme was also observed. Results are summarized as followings. 1) The pretreatment with riboflavin tetrabutylate inhibited completely the lengthened sleeping time due to CCl<sub>4</sub> treatment. 2) The increase of TBA value was prevented by the pretreatment with riboflavin tetrabutylate. 3) The pretreatment with riboflavin tetrabutylate also prevented the decrease of drug-metabolizing enzyme caused by CCl<sub>4</sub>. 4) Both retinoic acid and retinoid remarkably decreased the activity of aminopyrine demethylase. Pretreatment of riboflavin tetrabutylate, however, prevented inhibitory effect of retinoic acid on the enzyme activity.

약물대사에 중요한 역할을 하는 약물 대사 효소계는 간장세포 내의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하며 구성요소는 NADPH, NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase 및 cytochrome P<sub>450</sub> 등이 포함되어 있는 매우 복잡한 효소계로서 phenobarbital에 의하여 항진됨이 잘 알려져 있다.

한편, microsomal membrane이나 mitochondrial membrane의 구성성분인 인지질 내에는 비교적 많은 불포화 지방산이 포함되어 있어 과산화 지질현상으로 인한 세포 손상의 주된 표적이 되고 있으며 특히 항산화제의 일종인 butylated hydroxytoluene(BHT)은 과산화 현상에 의한 microsome 분획내 cytochrome P<sub>450</sub>의 함량저하의 강력한 억제작용이 있음이 밝혀졌다.

저자는 항산화 효과가 있는 비타민 B<sub>2</sub> 유도체인 riboflavin tetrabutylate(B<sub>2</sub>-but)를 이용하여 약물 대사 효소계의 일종인 aminopyrine demethylase와 지질의 과산화현상과의 상호관계를

**Table I**-Effect of riboflavin tetrabutylate (B<sub>2</sub>-but) on the secobarbital induced sleeping time of rat pretreated with CCl<sub>4</sub> or phenobarbital.

Pretreatment <sup>Ⓐ</sup>	Sleeping time (min) <sup>Ⓑ</sup>
None	70±3.0
Phenobarbital	No sleeping
CCl <sub>4</sub>	151±2.2***
Riboflavin tetrabutylate (B <sub>2</sub> -but)	77±6.5
Phenobarbital+B <sub>2</sub> -but	No sleeping
CCl <sub>4</sub> +B <sub>2</sub> -but	75±7.0 <sup>+++</sup>

Ⓐ Rats were pretreated intraperitoneally with a daily dose of phenobarbital (50mg/kg) or CCl<sub>4</sub> (0.1ml of 20v/v% solution in olive oil) for 3 days or one day, respectively. Riboflavin tetrabutylate (10mg/animal) was injected intraperitoneally for 3 days.

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

\*\*\*; P<0.001 compared with none group

+++; P<0.001 compared with CCl<sub>4</sub> group

검색하였다.

Riboflavin tetrabutylate가 CCl<sub>4</sub>에 의한 지질의 과산화현상 및 약물대사효소에 미치는 영향을 검색하기 위하여 우선 백서의 수면시간에 미치는 riboflavin tetrabutylate의 영향을 조사한 결과 Table I과 같다. 즉 phenobarbital 50mg/kg을 1일 1회씩 3일간 복강내에 투여한 군은 secobarbital을 30mg/kg투여하여도 전혀 수면현상을 보지 못하였으나 CCl<sub>4</sub>투여군에서는 정상군의 수면시간 70분에 비하여 151분으로 약 2배이상 연장되었다. 한편 riboflavin tetrabutylate투여군은 정상군에 비하여 수면시간에 별차이를 보지 못하였으나 CCl<sub>4</sub>와 riboflavin tetrabutylate를 병용투여한 군에서는 secobarbital에 의한 수면시간이 75분으로 CCl<sub>4</sub>투여군에서 연장된 수면시간이 완전히 억제되었음을 볼 수 있었다.

**Table II**-Effect of pretreated riboflavin tetrabutylate on TBA value and the activity of aminopyrine demethylase in rat given CCl<sub>4</sub>.

Treatment <sup>Ⓐ</sup>	TBA value (nmole/mg protein)	Aminopyrine demethylase (HCHO μmole/mg protein)
None	7.02±0.435	0.16±0.037
CCl <sub>4</sub> alone	10.51±0.300**	0.08±0.009***
B <sub>2</sub> -but+CCl <sub>4</sub>	6.62±0.495 <sup>++</sup>	0.13±0.020 <sup>++</sup>

Ⓐ Riboflavin tetrabutylate (10mg/animal) was given intraperitoneally twice a day for 2 days and CCl<sub>4</sub> (0.2ml of 20v/v% solution in olive oil) was administered intraperitoneally 3 hrs before sacrificed.

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

++; P<0.01 compared with CCl<sub>4</sub> group

CCl<sub>4</sub>독성에 미치는 riboflavin tetrabutylate 전 처치 효과는 Table II와 같다. 즉, riboflavin tetrabutylate를 olive oil에 현탁시켜 쥐에 (10mg/animal) 1일 2회씩 2일간 복강내에 투여하고 도살하기 3시간전에 CCl<sub>4</sub>를 투여한 결과, CCl<sub>4</sub>만을 투여한 대조군은 지질의 과산화현상의 최고인

TBA치가 10.51 nmole로서 정상군의 7.02nmole에 비하여 상당히 증가하였다. Aminopyrine demethylase의 활성도도 정상군의 0.16  $\mu$ mole/mg protein에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 투여한 군은 0.08 $\mu$ mole/mg protein으로 현저히 감소되었다. 그러나 riboflavin tetrabutylate로 전처치한 군은 TBA치가 6.62 nmole로써 CCl<sub>4</sub>만을 투여한 군에 비하여 현저히 낮아 TBA치의 상승을 상당히 억제하였다. 또한 aminopyrine demethylase의 활성도는 0.13  $\mu$ mole로 CCl<sub>4</sub>에 의한 활성도의 저하를 의의 있게 억제함을 볼 수 있다.

약물대사효소를 유도하는 phenobarbital을 전처치한 동물에서 riboflavin tetrabutylate의 효과는

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

Group <sup>Ⓐ</sup>	Treatment <sup>Ⓐ</sup>	TBA value (nmole/mg protein)	Aminopyrine demethylase (HCHO $\mu$ 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 <sub>4</sub>	14.52 $\pm$ 0.630***	0.12 $\pm$ 0.021**
Phenobarbital	B <sub>2</sub> -but+CCl <sub>4</sub>	14.16 $\pm$ 0.461	0.14 $\pm$ 0.012 <sup>+</sup>

<sup>Ⓐ</sup> Phenobarbital (50mg/kg/day) was injected intraperitoneally for 5 days. Rats were first pretreated with riboflavin tetrabutylate (10mg/animal) 3 hrs before treatment with CCl<sub>4</sub>. Then animal was sacrificed 3 hrs after CCl<sub>4</sub> treatment.

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

<sup>+</sup>; P<0.05 compared with CCl<sub>4</sub> group

**Table IV**—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.

Addition	TBA value(nmole/mg protein)		Aminopyrine demethylase (HCHO $\mu$ mole/mg protein)	
	None	B <sub>2</sub> -but (4 $\times$ 10 <sup>-5</sup> M) <sup>Ⓐ</sup>	None	B <sub>2</sub> -but (4 $\times$ 10 <sup>-5</sup> M)
Control	4.05 $\pm$ 0.010	3.94 $\pm$ 0.076	0.65 $\pm$ 0.001	0.94 $\pm$ 0.033
CCl <sub>4</sub> (40mM)	7.81 $\pm$ 0.470**	5.91 $\pm$ 0.246*	0.37 $\pm$ 0.016***	0.71 $\pm$ 0.069***
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O(40 $\mu$ M)	46.89 $\pm$ 0.448***	27.99 $\pm$ 1.395***	0.49 $\pm$ 0.035**	0.90 $\pm$ 0.041**
CoSO <sub>4</sub> (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**
EDTA(0.1mM)	4.73 $\pm$ 0.112*	3.65 $\pm$ 0.112	0.75 $\pm$ 0.081*	1.08 $\pm$ 0.073

<sup>Ⓐ</sup> Riboflavin tetrabutylate was dissolved in 20% propylene glycol and other experimental conditions were described in method.

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

Table III과 같다. 즉, phenobarbital(50mg/kg)을 백서 복강내에 1일 1회씩 5일간 투여하여 약물대사효소를 항진시킨 다음 CCl<sub>4</sub>의 간장독성에 미치는 riboflavin tetrabutylate효과를 검정하였다. Table III에서 보는바와 같이 phenobarbital을 투여한 대조군은 정상군에 비하여 TBA치 및 aminopyrine demethylase의 활성도는 약간 감소하였다. CCl<sub>4</sub> 투여 3시간전에 riboflavin tetrabutylate로 1회 전처치한 군에서는 TBA치나 aminopyrine demethylase의 활성도는 CCl<sub>4</sub>투여군에 비

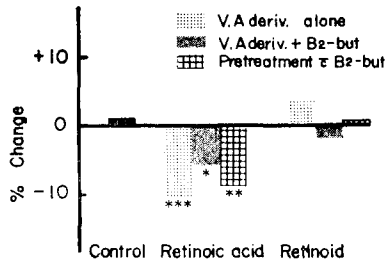


Fig. 1-The effect of B<sub>2</sub>-but on the changes of body weight in rats treated with vitamin A derivatives.

\* P<0.05

\*\* P<0.01

\*\*\* P<0.001

및 ascorbic acid를 첨가하여 증가한 TBA치는 각각 40% 및 30% 정도로 현저히 억제되었다. Aminopyrine demethylase의 활성도변화는 CCl<sub>4</sub>를 첨가한 것은 활성도가 현저히 저하되었으나 riboflavin tetrabutylate를 첨가한 것은 활성도의 저하가 억제되었다. 또한 Fe<sup>2+</sup> 및 ascorbic acid를 첨가한 것에서도 CCl<sub>4</sub>만을 첨가한 것에 비하여 riboflavin tetrabutylate를 첨가한 것이 유의있게 aminopyrine demethylase활성도를 저하하였다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 항산화제의 일종인 riboflavin tetrabutylate는 지질의 과산화현상을 억제하여 간세포내 smooth endoplasmic reiculum에 존재하는 약물대사효소를 보호하므로써 CCl<sub>4</sub>에 의한 간독작용을 억압할 수 있는 것으로 추측된다.

또한 steroid hormone과 유사하게 premalignant epithelial cell의 분화저지 효과도 가지고 있는 비타민 A 유도체인 retinoic acid 및 retinoid는 이들이 결핍되었을 때 chemical carcinogenesis 진행이 촉진되어 chemoprevention agent로서 시사되고 있다.

한편 retinoic acid는 심한 취액분비 기능장애를 가져오며 비타민 E에 의하여 호전된다고 보고하였다. 이에 저자는 retinoid 및 retinoic acid의 간장에 대한 독작용과 약물 대사 효소 및 지질의 과산화현상과의 상호관계를 검색하였다.

비타민 A 유도체 투여로 인한 흰쥐의 체중 변동은 제 1도에서 보는 바와같이 대조군에서는 101.5%로 약간 체중 증가를 보였으나 retinoic acid 투여군은 89.3%로 투여전보다 현저한 체중감소를 나타냈다. 또한 retinoic acid 투여군에서

하여 별변화가 없어 CCl<sub>4</sub>의 독성을 거의 억제하지 못하였다.

*In vitro*에서 riboflavin tetrabutylate 존재하에 CCl<sub>4</sub>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, ascorbic acid 및 EDTA를 첨가할 때 일어나는 TBA치 및 aminopyrine demethylase의 활성도변화는 Table IV에서 보는 바와 같다. *In vitro*에서도 CCl<sub>4</sub>를 첨가한 것은 TBA치가 현저히 증가하였다. Fe<sup>2+</sup> 및 ascorbic acid를 첨가한 것은 각각 약 12배 및 8배로 증가하였으나 Co<sup>2+</sup>와 EDTA를 첨가한 것은 별변화를 보지 못하였다. 그러나 riboflavin tetrabutylate를 첨가한 것은 CCl<sub>4</sub>에 의한 TBA치의 증가를 유의있게 억제하였다. 특히 Fe<sup>2+</sup>

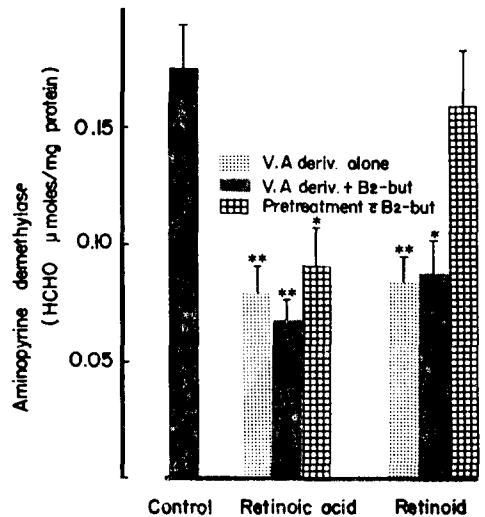


Fig. 2-The effect of B<sub>2</sub>-but on the activity of aminopyrine demethylase in rats treated with vitamin A derivatives.

\* P<0.05

\*\* P<0.01

\*\*\* P<0.001

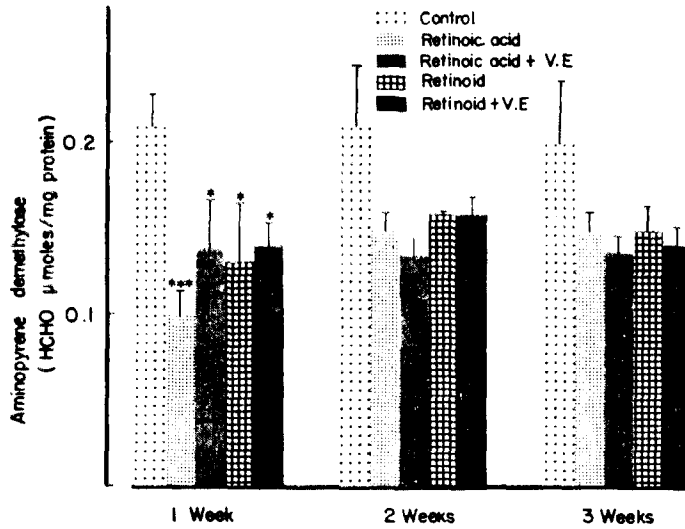


Fig. 3-The effect of vitamin E on the activity of aminopyrine demethylase in rats treated with vitamin A derivatives.

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$

는 riboflavin tetrabutylate 전치치 혹은 후치치에 무관하게 각 90.6% 혹은 93.9%로 체중감소를 보였다. 그러나 retinoid 투여군에서는 정상대조군과 비슷한 체중변동을 가져왔다.

Retinoic acid 혹은 retinoid 투여로 aminopyrine demethylase 활성도는 제 2 도에서와 같이 대조군 0.17  $\mu\text{mole/mg protein}$ 에 비하여 각각 0.08 및 0.084  $\mu\text{mole/mg protein}$ 으로 현저한 활성도저하를 초래하였다. 또한 비타민 A 유도체투여 후 riboflavin tetrabutylate 처치군에서도 0.06 혹은 0.09  $\mu\text{mole/mg protein}$ 으로 비타민 A 유도체 단독투여군과 별차없는 저하를 나타냈다. 그러나 riboflavin tetrabutylate를 3일간 전치치한 후 retinoid를 투여한 군에서는 0.16  $\mu\text{mole/mg protein}$ 으로 retinoid에 의한 효소활성도 저하를 저지하였다.

Aminopyrine demethylase 활성도에 대한 비타민 E의 효과는 제 3 도에 표시한 바와같이 retinoic acid 혹은 retinoid 투여 후 1주일에는 현저한 aminopyrine demethylase 활성도 저하를 보였다. 비타민 E 전치치 후 retinoic acid 투여군에서는 약한 demethylase 활성도저하의 저지경향을 나타냈다. 또한 투여 후 2주 혹은 3주군에서도 통계학적으로 유의있는 변동을 보여주지 못하였다.

이상의 실험결과로 riboflavin tetrabutylate 혹은 비타민 E 등은 일반적으로 비타민 A 유도체인 retinoic acid 혹은 retinoid에 의한 간장내 aminopyrine demethylase 활성도 저하에 큰 영향을 주지 못하였으며 이와같은 retinoid에 의한 demethylase 활성도 저하는  $\text{CCl}_4$ 에 의한 효과와 그 기전이 상이한 것으로 추측된다. 또한 riboflavin tetrabutylate와 BHT의 항산화효과와도 그 기전이 상이한 것으로 추측되며 다른 약물로 aminopyrine demethylase 활성도를 상승시킨 후 retinoid 및 riboflavin tetrabutylate의 영향을 더욱 검토해야 될 것으로 생각된다.

## 文 獻

1. A.L. Tappel, *Fed. Proc.* 32, 1870 (1973).

2. P. Hochstein, and L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 388 (1963).
3. B.A. Schacter, H.S. Marver, and U.A. Meyer, *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 221 (1972).
4. A.F. Welton, and S.D. Aust, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 661(1972).
5. O. Reiner, S. Athanassopoulos, K.H. Hellier, R.E. Murray, and H. Uehleke, *Arch. Toxicol.* **29**, 219 (1972).
6. R.O. Recknagel, *Pharmacol. Rev.* **19**, 145 (1967).
7. R.O. Recknagel, and E.A. Glende, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263 (1973).
8. T.F. Slater, and B.C., Sawyer, *Biochem. J.* **123**, 805 (1971).
9. E.D. Wills, *Biochem. J.* **123**, 983 (1971).
10. S. Orrenius, G. Dallner, and L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 329 (1964).
11. J. Cochin, and J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exp* **125**, 105 (1959).
12. W.G. Niehaus, and B. Samuelson, *Eur. J. Biochem.* **6**, 126 (1968).
13. J. Högberg, A. Bergstrand, and S.V. Jakobsson, *Eur. J. Biochem.* **37**, 51 (1973).
14. E.D. Wills, *Biochem. Pharmacol.* **21**, 239 (1972).
15. J.R. Gillette, J.R. Mitchell, and B.B. Brodie, *Ann. Rev. Pharm.* **14**, 271 (1974).
16. E.A. Glende, A.M. Hruszkewycz, and R.O. Recknagel, *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2163 (1976).
17. Y. Masuba, and T. Murano, *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1983 (1978).
18. M.F. Sorrell, D.J. Tuma, A.J. Barak, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **143**, 839 (1977).
19. D.J. Tuma, M.F. Sorrell, and A.J. Barak, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**, 953 (1974).
20. H.K. Hahn, D.J. Tuma, and A.J. Barak, *Biochem. Pharmacol.* **27**, 769 (1976).
21. H.K. Hahn, A.J. Barak, D.J. Tuma, and M.F. Sorrell, *Biochem. Pharmacol.* **26**, 164, (1977).
22. A.H. Conney, *Pharmacol. Rev.* **19**, 317 (1967). T. Kamataki, and H. Kitagawa, *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3199 (1973).
24. S. Matsuoka, K. Tahara, and H. Ohama, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **20**, 333, (1974),
25. K. Tahara, S. Matsuoka, and H. Ohama, *Nutr. Sci. Vitaminol.* **20**, 81 (1974).
26. E.D. Wills, *Biochem. J.* **113**, 331 (1969).
27. P.C. Nettesheim, M.L. Snyder, McV. Cone Williams and J.C. Kim, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 54 (1975).
28. S.M. Cohen, J.F. Wittenberg, and G.T. Bryan, *Fed. Proc.* **33**, 602 (1974).
29. A.E. Rogers, B.J. Herndon, and P.M. Newberene, *Cancer Res.*, **1003**, 1009 (1973).
30. R.L. Merriman, and J.S. Bertram, *Cancer Res.* **39**, 1661-1666 (1979).
31. H. Mayer, W. Bollag, R. Hänni and R. Rüegg, *Experientia* **34**, 1105-1119 (1978).
32. G. Wessmann, J.W. Uhr and L. Thomas, *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.* **112**, 284 (1963).
33. P. Nettesheim, C. Snyder, M.L. Williams, M.V. Cone, and J.C. Kim, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 54 (1975).
34. C.J. Grubbs, R.C. Moon, R.A. Squire, G.M. Farrow, S.F. Stinson, D.G. Goodman, C.C. Brown, and M.B. Sporn, *Science* **198**, 743 (1977).
35. C.A. Reznikoff, D.W. Brankow and C. Heidelber, *Cancer Res.* **33**, 3231 (1973).
36. W. Bollag, *Eur. J. Cancer*, **8**, 689 (1972).
37. W. Bollag, *Chemotherapy* **21**, 236 (1975).
38. L. Prutkin and B. Bogart, *J. Invest. Dermatol.* **54**, 126 (1970).
39. R. Shamberger, *J. Natl. Cancer Inst.* **47**, 667 (1971).

40. R. Lotan and G.L. Nicolson, *J. Natl. Cancer Inst.* **59**.
41. R.L. Merriman and J.S. Bertram, *Cancer Res.* **39**, 1661 (1979).
42. D.L. Hill and T.W. Shih, *Cancer Res.* **34**, 564 (1974).
43. L.W. Wattenberg, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 3 (1972).
44. B.M. Ulland J.H. Weiburger, R.S. Yamamoto and E.K. Weisburger, *Food Cosmet. Toxicol* **11**, 199 (1973).
45. J.T. Dingle and J.A. Lucy, *Biol. Rev.* **40**, 422 (1965).
46. J.C. Bauernfeind, H. Neumark and M. Brin, *Amer. J. Clin. Nutr.* **27**, 234 (1974).