

한우와 돼지에서 간의 약물 대사효소의 활성 비교

이관복 · 윤효인 · 박승춘* · 김민규 · 이내경 · 조준형** · 이동우***

충남대학교 수의과대학 약리독성학교실 · (주)대성미생물부설연구소*
수의과학연구소** · 한국인삼연초연구소***

(1997년 9월 3일 접수)

Comparative liver drug metabolizing enzymes activities between Korean native cattle and swine

Gwan-bok Lee, Hyo-in Yun, Seung-chun Park* , Min-kyu Kim, Rae-kyung Lee,
Joon-hyung Cho** , Dong-woo Lee***

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

*Research Lab, Dae Sung Microbiologicals, Co., Ltd.**

*National Veterinary Research Institute***

*Korea Research Institute of Ginseng & Tobacco****

(Received Sep 3, 1997)

Abstract : Drug-metabolizing activities of Korean native cattle and swine were investigated from viewpoints of the cytochrome P-450's level, their dependent mixed function oxidase activities, the reactive oxygen species formation and cytosolic enzyme activities from each liver homogenates. Level of cytochrome P-450 in the liver microsome of Korean native cattle was 0.28 ± 0.05 nmole/mg and that in pigs 0.35 ± 0.03 nmole/mg. Level of cytochrome b₅ of Korean native cattle was 0.24 ± 0.06 nmole/mg, and that of pigs 0.2 ± 0.05 nmole/mg, showing no difference between two species. NADPH P-450 reductase were higher in Korean native cattle (58.3 ± 5.3 nmole/mg/min) than in pigs (29.9 ± 3.8 nmole/mg/min) ($p < 0.01$). The activities of cytochrome P-450 dependent monooxygenases such as ethoxyresorufin O-deethylase (cattle, 96.5 ± 12.5 nmole/mg/min ; pigs, 13.6 ± 2.1 nmole/mg/min), N-benzphetamine N-demethylase (cattle, 5.23 ± 0.82 nmole/mg/min ; pigs, 0.76 ± 0.3 nmole/mg/min) and aniline hydroxylase (cattle, 0.95 ± 0.1 nmole/mg/min ; pigs, 0.33 ± 0.08 nmole/mg/min) were much higher in Korean native cattle than in swine ($p < 0.01$). However, the activity of testosterone 7 α -hydroxylase was higher in swine (90.4 ± 1.2 nmole/mg/min) than cattle (cattle, 32.8 ± 1.2 nmole/mg/min). Interestingly, testosterone 16 α -hydroxylase, a marker enzyme for P-450 IIA was not detected in both animal species. These results suggest that Korean native cattle and pigs have high contents of P-450 IA1 and P-450 IIIA. Total sulfhydryl

compound (cattle, $10.3 \pm 1.1 \text{ nmole/mg}$; pigs, $14.5 \pm 1.8 \text{ nmole/mg}$) and glutathione related enzymes except glutathione reductase (cattle, $38.1 \pm 7.9 \text{ nmole/mg/min}$; swine, $22 \pm 3.6 \text{ nmole/mg/min}$) showed higher levels in swine than in Korean native cattle. Superoxide dismutase (cattle, $7.64 \pm 0.84 \text{ nmole/mg/min}$; pigs, $4.47 \pm 0.94 \text{ nmole/mg/min}$) and catalase (cattle, $30.4 \pm 3.7 \text{ nmole/mg/min}$; pigs, $17.2 \pm 1.8 \text{ nmole/mg/min}$) were remarkably higher in Korean native cattle than in swine ($p < 0.05$).

Key words : Korean native cattle, pig, cytochrome P-450, superoxide, catalase.

서 론

가축에 있어서 대부분의 약물이 체외로 배출되기 위해서는 대사와 배설의 두 과정을 거치게 된다. 대사는 지용성 물질을 수용성 물질로, 비극성 물질을 극성물질로 변환시킴으로써 체외로 배설을 용이하게 하는 과정이며, 약리학적 측면에서는 활성의 물질을 비활성 물질로 그리고 독성물질을 비독성물질로 전환시키는 특성을 가지고 있다. 그러나 생체의 약물대사가 항상 체외배설의 용이화 및 불활성화로 진행되는 것이 아니고 일부의 약물은 오히려 비극성이 증대될 수도 있으며, 대사과정을 거친 후 더욱 활성이 증대되든지 또는 독성을 획득할 수도 있다^{1,2}.

대사과정은 주로 간세포내에 있는 마이크로솜의 mixed function oxidase(MFO) system에 의하여 이루어진다. 간장의 약물대사계는 phase I 반응과 phase II 반응으로 나눌 수 있으며 MFO system은 phase I 반응을 주로 담당하고 있다. Phase I 반응의 대사산물 일부는 phase II 반응의 기질이 되기 때문에 이 두 반응은 상호 깊은 관련이 있다³. Cytochrome P-450은 MFO system의 가장 중요한 요소로서 세포내의 내형질세망체에 결합되어 있는 일종의 hemeprotein이다⁴⁻⁶. Cytochrome P-450은 많은 isozyme으로 구성되어 있으며 대체로 기질 특이성을 가지고 있으나 중첩되는 경우도 많이 있음이 알려져 있다. MFO system은 cytochrome P-450, NADPH P-450 reductase, cytochrome b₅, NADH b₅ reductase 등으로 구성되어 있으며 분자상의 산소와 이들의 상호작용에 의해 다양한 종류의 내인성 및 외인성 물질의 산화 환원반응을 촉매한다^{7,8}.

이 반응에 의하여 생성된 활성산소는 약물의 hydroxyl화에 이용되지만 일부는 막을 구성하는 지질에 손상을 유발시키기도 한다^{9,10}. 이 효소계에 의한 약물대사 과정에 나타날 수 있는 독성은 cytochrome P-450 isozyme의 종류 및 그 활성도와 깊은 관계가 있다¹¹⁻¹².

본 연구에서는 우리나라에서 가장 널리 사육되고 있는 가축인 한우와 잡종돼지에서 약물대사에 중요한 역할을 수행하는 혼합기능 산화효소와 glutathione 관련효소의 활성도와 약물대사 과정에 생성되는 반응성 활성산소 및 항산화효소의 활성도를 측정함으로써 이들 가축종에 있어서의 약물대사 연구에 관한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시 약 : NADP, NADH, NADPH, cytochrome c, ethox- yresorufin, catalase, sodium azide, testosterone, reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione(GSSG), glutathione reductase, glucose-6-phosphate(G-6-P), testosterone(TST) 2 β -, 6 β -, 7 β -, 11 β -, 16 α -, 16 β -hydroxy testosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH), aniline, epinephrine, ethoxycoumarin, trichloroacetic acid, benzphetamine, bovine serum albumin(BSA), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) 등은 Sigma Chemical사의 제품을 그리고 ethyl acetate, methanol, acetic acid, isopropyl alcohol, TLC plates(Merck Art 5629), chloroform 등은 Merck사 제품을, 그 외 시약은 특급 또는 1급을 사용하였다.

사용기기 : Spectrophotometer(Varian Cary 17-D), spectrofluometer(Farrand MK-TA), 원심분리기(DuPont/Sorvall II

RS-28S, Sorvall OTD-65), homogenizer(OMNI), TLC-scanner (CAMAG HP-TLC Scanner II) 등을 사용하였다.

공시동물 : 본 실험에 사용한 동물은 한우와 잡종 돼지(Landrace x Yorkshire, F₂)이었다. 도축장에서 도살을 위해 계류되고 있는 한우와 돼지를 무작위 추출하여 표본을 선정하고, 담당검사원의 검사과정을 거친 후 도살한 각 4마리로부터 신속하게 간장을 적출하여 130mM HEPES 완충액을 처리한 후 즉시 실험실로 운반하였다. 실험에 사용된 동물의 체중은 한우가 450±23kg, 돼지는 100±11kg이었다. 도살시 한우의 연령은 1.9±0.1년, 돼지는 0.7±0.1년으로 모두 웅성이었다.

시료조제 : 시료조제는 Bansal *et al*¹³의 방법에 따라 다음과 같이 조제하였다. 즉, 도축직후 적출한 간을 1:4 (w/v)의 비율로 150mM KCl을 함유하는 130mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 균질화한 다음, 원심분리(700g, 20분; 11,000g, 30분; 105,000g, 60분)하여 세포질 분획과 pellet를 분리하였다. Pellet는 다시 상기 완충액으로 부유시킨 후 원심분리(105,000g에서 60분)를 재차 시행하였으며, 얻어진 pellet를 건조된 1g에 대하여 완충액 1ml의 비율로 재균질화하여 마이크로솜 분획을 만들고 -70℃에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry *et al*¹⁴의 방법에 따라 측정하였다. 이 모든 조작은 4℃에서 수행되었다.

Mixed function oxidase의 주요성분측정 : Cytochrome P-450(P-450) 정량은 Omura와 Sato⁴의 방법에 따라 마이크로솜을 0.1M 인산염 완충액(pH 7.5)으로 1.0 mg/ml가 되도록 희석하고, 분광광도계의 reference 및 sample cuvette에 각각 1ml씩 주입한 후 Na₂S₂O₄ 약 1mg을 첨가하였다. 그리고 sample cuvette에만 CO gas를 약 2분간 거품이 나오도록 통과시킨 후 450nm와 490nm에서의 흡광도 차이를 측정하였으며, 밀리몰 흡광계수(91mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 P-450 함량을 결정하였다. NADPH cytochrome P-450 reductase(P-450 reductase) 활성도 측정은 William과 Kamin¹⁵의 방법에 따라 분광광도계의 reference 및 sample cuvette에 0.2μM cytochrome c 0.3ml와 0.3ml의 간 마이크로솜 부유액(단백질 0.25mg/ml)을 가하고 인산염완충액(pH 7.7)으로 총용량을 1.5ml로 맞추었다. 그리고 sample cuvette에 0.1μM NADPH 0.1ml를 첨가하고, 550nm에서 3~4 분간 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 cytochrome c의 밀리몰흡광계수 (21mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 계산하였으며, 분당 1nmole을 변화시

키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. Cytochrome b₅(b₅) 정량은 Omura와 Sato⁴의 방법에 따라 분광광도계의 reference 및 sample cuvette에 간 마이크로솜의 단백질이 1mg/ml의 농도가 되게 만든 희석액을 각각 995μ씩 주입한 다음 base line을 조절하였다. 그리고 시료 cuvette에 다시 30mM NADH 5μ를 첨가하고 426nm와 409nm에서 흡광도의 차이를 측정하였으며 이를 NADH의 밀리몰흡광계수(185mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 cytochrome b₅의 함량을 결정하였다. NADH cytochrome b₅ reductase(b₅ reductase) 활성도 측정은 Mihara와 Sato¹⁶의 방법에 따라 분광광도계의 reference 및 sample cuvette에 0.1μM 인산염완충액(pH 7.5) 0.85ml, 40mM potassium ferricyanide 0.05ml를 첨가하였다. 그리고 간 마이크로솜 단백질이 1mg/ml가 되게 만든 희석액 50μ를 넣어 혼합한 후 37℃에서 분광광도계의 base line을 맞추었다. 이 sample cuvette에 4mM NADH 50μ를 첨가하고 420nm에서 potassium ferricyanide의 환원속도로 3~4분간 측정하고, 밀리몰흡광계수(1.02mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 활성도를 계산하였다. b₅의 unit도 분당 1nmole의 potassium ferricyanide를 환원시키는 효소의 양으로 정의하였다.

Cytochrome P-450 의존성 monooxygenase 활성도 측정 : Ethoxycoumarin O-deethylase(ECOD) 활성도는 Greenlee와 Poland¹⁷의 방법에 따라 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4) 650μl, 마이크로솜(1mg/ml) 30μl, BSA(20mg/ml) 50μl와 NADPH(0.42mg), NADH(0.36mg)를 첨가한 후 0.02M 7-ethoxycoumarin(50% methanol) 25μl 및 증류수를 넣어 총용량 1ml로 반응을 시작하였다. 이 용액을 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, 15% TCA(w/v) 0.125ml와 chloroform 2ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 이 반응액을 1분간 잘 혼합한 후 37℃에서 10분간 충분히 진탕하여 생성물을 추출하고 1ml의 유기용매층을 0.1N NaOH/0.1M NaCl과 혼합하여 이행시킨 다음, excitation 파장 370nm, emission 파장 450nm에서 형광도를 측정하였다. Ethoxyresorufin O-deethylase(EROD) 활성도는 Burke *et al*¹⁸의 방법에 따라 0.1M Tris 완충액(pH 7.4) 705μl에 10μM ethoxyresorufin 20μl, 마이크로솜 단백질 100μl (1mg/ml), 100mM MgCl₂ 25μl, 2M KCl 25μl, G-6-PDH 0.06 unit, 60mM G-6-P 25μl, 10mM NADPH 50μl, 2.5mM NADP 25μl를 넣고 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, 2.5ml methanol을 넣어 반응을 중지시키고 2,000g에서 5분간 원심분리하여 spectrofluorometer의 excitation 파장 510nm,

emission 파장 586nm에서 생성된 resorufin의 형광도를 측정하고, resorufin으로 표준검량선을 만들어 농도를 계산하였다. 효소의 단위는 위 조건에서 분당 1 mole의 resorufin을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. Benzphetamine N-demethylase(BPDM) 활성도는 Thomas *et al*¹⁹의 방법에 따라 0.1M 인산염 완충액(pH 7.6) 1.5ml, 2M MgCl₂ 50μl, NADPH(20mg/ml) 100μl, NADH (20mg/ml) 100μl와 마이크로솜 단백질 200μg을 혼합한 후 40mM benzphetamine 50μl를 넣어 총용량 2ml로 한 다음, 반응을 시작하였다. 37℃에서 10분 반응시킨 다음, 20% ZnSO₄ 0.25ml와 포화 Ba(OH)₂ 0.25ml로 반응을 중단시키고 0℃에서 20분간 방치한 후 원심분리(2,000g, 10분)하였다. 상층액 1.5ml 취하여 0.6ml의 Nash 시약²⁰을 첨가하여 반응시키고 412nm에서 형성된 HCHO 농도를 측정 후 HCHO의 몰흡광계수(8,000M⁻¹cm⁻¹)에 적용하여 효소활성도를 계산하였다. Aniline hydroxylase (AH)의 활성도는 Peter *et al*²¹의 방법에 의하여 40mM 인산염 완충액(pH 7.0) 485μl에 5.6mM MgCl₂, 84mM KCl, 12.4mM G-6-P, 3mM NADP, 0.06 단위 G-6-PDH, 268mM aniline 15μl를 넣었다. 그리고 마이크로솜 단백질(1mg/ml)을 혼합한 후 37℃에서 10분간 반응시키고 20% TCA 400μl로 반응을 정지시켰다. 이를 2,000g에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.5ml에 0.5ml phenol(1% phenol/0.5N NaOH)과 1M Na₂CO₃ 0.5ml를 혼합하여 반응시킨 후 분광광도계 630nm에서 흡광도를 측정하고, 측정값을 p-aminophenol의 밀리몰흡광계수(10.135M⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 효소활성도를 계산하였으며 분당 1 mole의 기질을 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Testosterone(TST) hydroxylase 활성도는 Lee *et al*²²의 방법에 따라 2mM TST를 methanol에 녹인 후 시험관에 각각 50μl 넣은 다음, N₂ gas로 건조하였다. 마이크로솜 단백질이 1mg/ml 되게 0.1mM EDTA와 3% glycerol을 함유하는 62.5mM 인산염 완충액(pH 7.5)으로 희석한 후 0.5ml를 취하고, 이에 3mM NADPH 100μl를 넣어 반응을 시작하였다. 37℃ 진탕 수조에서 10분 반응시킨 후 2ml의 ethylacetate를 넣어 반응을 중지하고 잘 혼합한 후 원심분리(2,000g, 5분)하였으며, 상층액을 screw cap tube에 취하였다. 다시 추출과정을 1회 반복하였으며, 2회 취한 상층액을 N₂ gas로 완전히 건조시킨 다음, 100μl의 ethylacetate로 재용해하였다. 표준 monohydroxy-TST와 동시에 HPTLC plate에 전개하여 생성된 대사산물의 종류를 분리하였다. 그

리고 HPTLC scanner로 scanning 하여 검량선을 구하고 농도를 계산하였다. 전개용매는 dichloromethane : acetone : isopropyl alcohol(15 : 2.5 : 0.5)을 사용하였다.

Sulfhydryl 화합물과 관련효소 측정 : Glutathione-S-transferase(GST) 활성도는 Habig *et al*²³의 방법에 따라 시험관에 20mM GSH 50μl, 세포질분획 단백질(0.25mg/ml) 50μl와 100mM CDNB 10μl를 넣고 0.1M 인산염 완충액(pH 6.5)으로 용량을 1ml로 하였다. 그리고 시료용액을 잘 혼합한 다음, 340nm에서 3~4분 동안 흡광도 변화를 측정하고 CDNB의 밀리몰흡광계수(9.6mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 효소의 활성도를 계산하였다. Glutathione peroxidase(GSH peroxidase) 활성도는 Flohe와 Gunzler²⁴의 방법에 따라 시험관에 4mM EDTA를 함유한 0.3M 인산염 완충액(pH 7.0) 1ml, 세포질 분획 30μl, 25.6mM sodium azide 500μl, 294.37mM GSH 60μl, 8.4mM NADPH 110μl, glutathione reductase(5mg/ml) 5μl, 증류수 975μl와 기질인 1mM cumene hydroperoxide 320μl를 넣어 총용량을 3ml로 하였다. 그리고 시료용액을 잘 혼합한 다음, 340nm에서 3~4분간 NADPH 농도에 의한 흡광도의 감소를 측정하고 NADPH의 밀리몰흡광계수(6,200M⁻¹cm⁻¹)를 적용하여 효소의 활성도를 계산하였다. 유리 sulfhydryl 화합물(Free-SH)과 총 sulfhydryl 화합물(T-SH) 함량측정은 Sedlak과 Lindsay²⁵의 방법에 따라 시험관에 0.2M Tris 완충액(pH 8.2) 300μl, 세포질 분획 25μl, 0.01M DTNB 20μl, methanol 1580μl와 증류수 75μl를 넣어 총용량을 2ml로 하였다. 그리고 20℃의 수조에서 반응시키고 원심분리(2,000g, 15분)하였다. 그 상등액을 취하여 412nm에서 흡광도를 측정 후 SH가 결합된 DTNB의 밀리몰흡광계수(13,100M⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 함량을 계산하였다. Free-SH기의 함량측정은 시험관에 세포질분획 250μl, 증류수 1,550μl와 20% TCA 200μl를 넣어 총 2ml로 한 후, 위와 같은 방법으로 2℃에서 15분 동안 반응시킨 다음, 원심분리하여 얻은 상등액에서 측정하였다. Glutathione reductase(GSH reductase) 활성도는 Racker *et al*²⁶의 방법에 따라 시험관에 세포질분획 10μl, EDTA 용액(10mg/ml) 35μl, 66.01mM GSSG 50μl와 9.184mM NADPH 20μl를 넣고 0.1M Tris 완충액(pH 8.0)을 넣어 총용량을 1ml로 하였다. 그리고 시료용액을 잘 혼합한 다음, 340nm에서 3~4분 동안 NADPH 농도에 의한 흡광도의 감소율을 측정하고 NADPH의 몰 흡광계수(6,200M⁻¹cm⁻¹)를 적용하여 계산하였다.

활성산소의 항산화 효소 측정 : Superoxide radical의 생성량은 측정은 Aust *et al*²⁷의 방법에 따라 시험관에 0.15M 인산염 완충액(pH 8.5) 750 μ l, 마이크로솜 단백질(1mg/ml) 50 μ l, 5mM epinephrine 100 μ l와 1mM NADPH 100 μ l를 넣었다. 그리고 시료용액을 잘 혼합한 다음, superoxide에 의해 epinephrine이 adrenochrome으로 산화되는 흡광도의 변화를 480nm에서 측정(10~18분)하고, adrenochrome의 몰 흡광계수(4.02M⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 계산하였다. Hydrogen peroxide의 생성량 측정은 Alfred *et al*²⁸의 방법에 의해 시험관에 100mM Tris 완충액(pH 7.5) 500 μ l, 마이크로솜 단백질(1mg/ml) 100 μ l, 3M KCl 50 μ l, catalase(2,000U/ml) 50 μ l, 0.2M MgCl₂ 50 μ l와 5mg/ml NADPH 25 μ l를 넣고 증류수를 넣어 총 1ml로 한 다음 반응을 시작하였다. 30 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 다음, 15% TCA를 넣고 원심분리(2,000g, 15분)하였다. 그리고 그 상등액 1.5ml를 취하여 Nash 시약을 첨가한 후 58 $^{\circ}$ C에서 8분 동안 가온하여 발색시켰다. 412nm에서 흡광도를 측정하여 HCHO의 몰리몰흡광계수(17.8mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 계산하였다. Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정은 McCord *et al*²⁹의 방법에 의해 xanthine과 xanthine oxidase의 존재하에 생성되는 superoxide anion에 의해 cytochrome c가 환원되는 것을 억제시키는 반응원리를 이용하였다. 즉, 3.0ml 용량의 cuvette에 0.1mM의 EDTA를 함유하는 50mM 인산염 완충액(pH 7.8) 2.1ml와 0.5mM xanthine 0.3ml 및 0.1mM cytochrome c 0.3ml를 가한 다음, cytochrome oxidase에 의한 환원형의 cytochrome c의 재산화화를 막기 위해 반응액에 50 μ M potassium cyanide 0.1ml를 가하였다. 반응액의 미립자를 분해시키기 위해서 sodium deoxycholate(0.1mg/ml)를 0.1ml 넣어 0.003% 되도록 하였다. 혼합액을 잘 섞은 다음, xanthine oxidase 0.1ml와 세포질 분획 10 μ l를 첨가한 후 550nm에서 흡광도 변화를 결정하였다. 흡광도 증가에 대한 기준은 xanthine oxidase의 농도를 조절하여 흡광도 증가를 분당 0.021이 되도록 하였으며, 활성도는 log 0.021-log sample OD/log 2의 식으로 unit을 계산하였다. Catalase의 활성도는 Acebi *et al*³⁰의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 3ml cuvette에 130mM 인산염 완충액(pH 7.0) 500 μ l, 세포질 분획 40 μ l, 증류수 660 μ l와 기질인 15mM hydrogen peroxide 용액 1,800 μ l를 가하고 잘 혼합한 다음, 파장 240nm에서 hydrogen peroxide가 감소되는 양을 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안에 1 mole의 hydrogen pe-

roxide를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

통계학적 검정 : 한우와 돼지에서 종차에 의한 간 이물질 대사효소의 활성에 관한 통계학적 유의성 검정은 Student's *t*-test 방법을 이용하였으며, p<0.05일 경우 유의하다고 판정하였다.

결 과

Mixed function oxidase의 주요 구성성분의 수준 비교 : 한우와 돼지의 간 마이크로솜에서 cytochrome P-450의 함량과 cytochrome P-450 reductase의 활성도 및 cytochrome b₅와 NADH b₅ reductase의 활성도를 측정하여 비교한 결과는 Fig 1과 같다. 한우의 P-450 함량은 단백질 mg당 0.28 \pm 0.05nmole이었고, 돼지는 0.35 \pm 0.03nmole로서 한우가 돼지에 비해 낮았으나 통계학적으로 유의성은 없었다. 그러나 P-450 reductase는 한우가 29.9 \pm 3.8 nmole/mg/min, 돼지가 58.3 \pm 5.3nmole/mg/min로서 돼지가

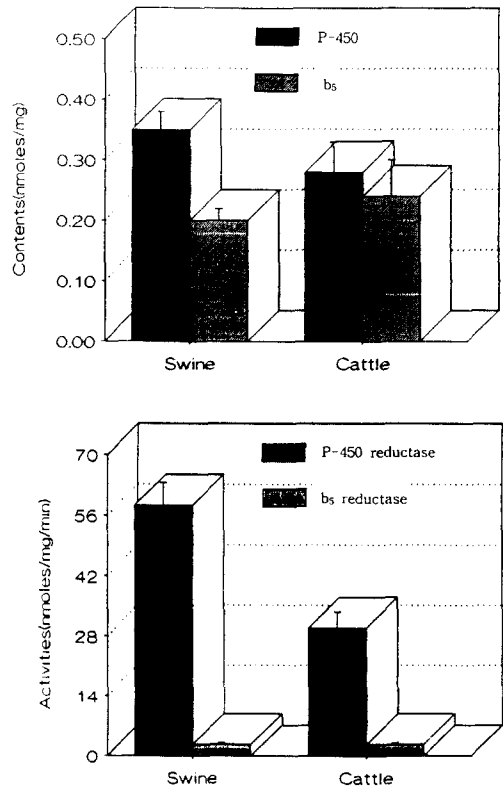


Fig 1. Major components of mixed function oxidases in hepatic microsomes of swine and cattle.

높은 활성도를 나타내었다($p < 0.01$). 또 b_5 의 함량은 한우가 $0.24 \pm 0.06 \text{ nmole/mg/min}$, 돼지가 $0.20 \pm 0.02 \text{ nmole/mg/min}$ 로서 한우가 높게 나타났으나 유의한 차이를 나타내지 않았다. b_5 reductase는 한우가 $2.73 \pm 0.28 \text{ nmole/mg/min}$, 돼지가 $2.70 \pm 0.41 \text{ nmole/mg/min}$ 로 P-450과 P-450 reductase와는 상반된 결과를 나타내었다.

P-450 의존성 monooxygenase의 활성도 비교 : P-450 isozyme의 특성을 구명하기 위하여 ECOD, EROD, BPDM, AH, TST hydroxylase의 활성도를 측정하여 Table 1 및 Fig 2, 3에 나타내었다. Fig 2에서와 같이 ECOD의 활성도는 $24.5 \pm 2.9 \text{ nmole/mg/min}$, 돼지가 $27.9 \pm 4.4 \text{ nmole/mg/min}$ 로서 한우에 비해 돼지가 높았으나 통계적으로 유의성은 없었다. EROD의 활성도는 한우가 $96.5 \pm 12.5 \text{ nmole/mg/min}$, 돼지가 $13.6 \pm 2.1 \text{ nmole/mg/min}$ 로서 한우가

Table 1. Activities of testosterone monohydroxylase in the liver of cattle and swine

Testosterone monohydroxylases ^a	Swine	Cattle
2 β -OH-T	33.7 \pm 5.9	37.2 \pm 13.0
6 β -OH-T	83.0 \pm 3.9	208.1 \pm 7.70*
7 α -OH-T	90.4 \pm 1.2	32.8 \pm 1.2*
11 β -OH-T	15.4 \pm 0.7	34.8 \pm 3.1*
16 α -OH-T	ND	ND
16 β -OH-T	49.1 \pm 3.4	120.3 \pm 13.9*

a : pmoles/mg/min, ND : not detectable, OH-T : hydroxylated testosterone. Values are the mean \pm SD with 4 male cattle and swine, respectively.

* Values of cattle were significantly different from those of swine($p < 0.01$).

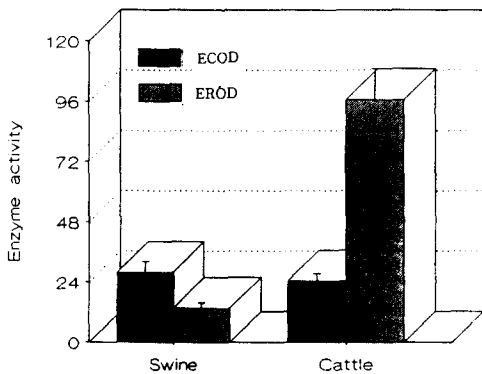


Fig 2. Activities of P-450 dependent monooxygenases in hepatic microsomes of swine and cattle. ECOD : arbitrary unit, EROD : pmoles/mg/min.

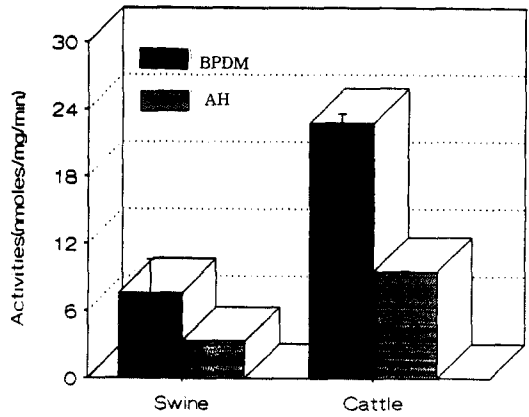


Fig 3. Activities of P-450 dependent monooxygenases in hepatic microsomes of swine and cattle.

높은 결과를 나타냈다($p < 0.01$). BPDM의 활성도는 한우가 $2.23 \pm 0.82 \text{ nmole/mg/min}$, 돼지가 $0.76 \pm 0.30 \text{ nmole/mg/min}$ 로서 한우가 현저히 높은 활성도를 나타냈고($p < 0.01$), AH의 활성도 역시 한우가 $0.95 \pm 0.10 \text{ nmole/mg/min}$, 돼지가 $0.33 \pm 0.08 \text{ nmole/mg/min}$ 로서 한우가 높은 결과를 보여주었다($p < 0.01$). TST hydroxylase의 활성도는 Table 1과 Fig 4에 나타내었다. TST의 대사산물은 11개를 확인할 수 있었다. 돼지와 한우에 있어서 6 β -는 $83.0 \pm 3.9 \text{ pmole/mg/min}$, $208.1 \pm 7.7 \text{ pmole/mg/min}$, 7 α -는 $90.4 \pm 1.2 \text{ pmole/mg/min}$, $32.8 \pm 1.2 \text{ pmole/mg/min}$, 16 β -는 $49.1 \pm 3.4 \text{ pmole/mg/min}$, $120.3 \pm 13.9 \text{ pmole/mg/min}$ 로서 두 동물간에

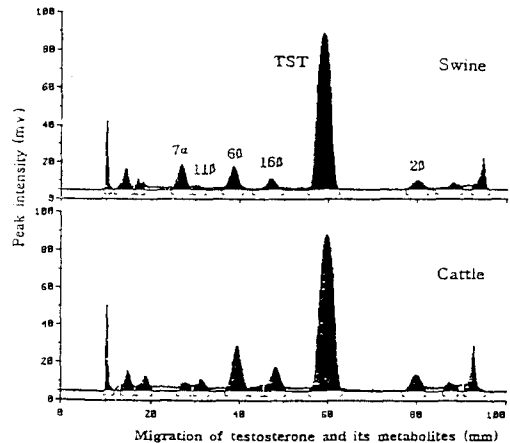


Fig 4. HPTLC profiles of testosterone and its metabolites from microsomal biotransformation of swine and cattle.

뚜렷한 차이를 나타내었으나($p < 0.01$), 16 α -는 돼지, 한우 모두에서 검출되지 않았다. Total-SH는 종간에 비슷한 수준을 보여주었고, free-SH는 한우에 비해 돼지가 3배 정도 높은 함량을 나타냈다($p < 0.01$).

Free-SH 및 T-SH와 GSH 관련 효소들의 활성 비교 : Free-SH기와 T-SH의 함량 및 GSH peroxidase, GSH reductase, GSH-S-transferase의 활성도는 Fig 5, 6 및 7과 같다. Free-SH 화합물의 함량은 조직 g당 한우가 0.37 ± 0.12 nmole이고, 돼지는 1.05 ± 0.20 nmole로 돼지가 한우보다 높았으며($p < 0.01$), T-SH 화합물의 함량은 한우가 10.3 ± 1.1 nmole이고, 돼지는 14.5 ± 1.8 nmole로서 Free-SH의 함

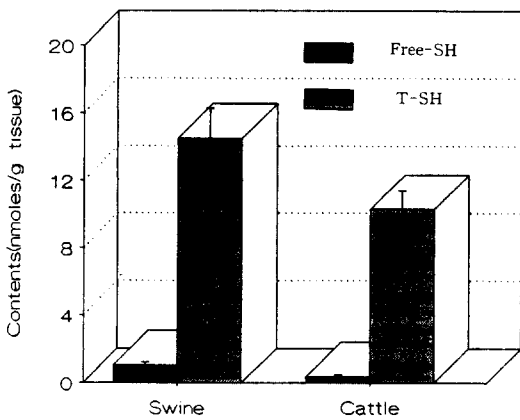


Fig 5. Contents total-SH group and free-SH group in hepatic cytosols from swine and cattle.

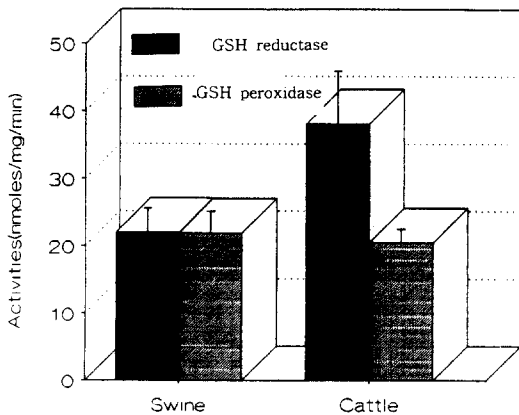


Fig 6. Activities of GSH peroxidase and GSH reductase in hepatic cytosols from pigs and cattle.

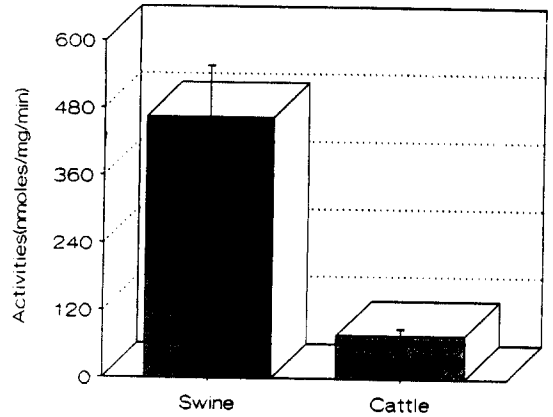


Fig 7. Activities of GSH-S-transferase in hepatic cytosols from swine and cattle.

량과 유사한 경향을 보여주었다($p < 0.01$). Phase II 반응의 하나로서 대사산물을 GSH와의 conjugation 반응을 촉매하는 GSH-S-transferase의 활성도는 한우와 돼지가 각각 77.2 ± 11.8 unit 및 464.4 ± 91.6 unit로 돼지가 현저하게 높은 활성을 나타내었다($p < 0.01$). 그러나 GSH reductase의 활성도는 한우가 38.1 ± 7.9 unit, 돼지가 22.0 ± 3.6 unit로 오히려 한우가 약 2배 높은 값을 보여주었다($p < 0.05$). GSH peroxidase의 활성도는 한우와 돼지가 각각 20.5 ± 2.0 unit, 21.9 ± 3.2 unit로 상호 차이가 없었다.

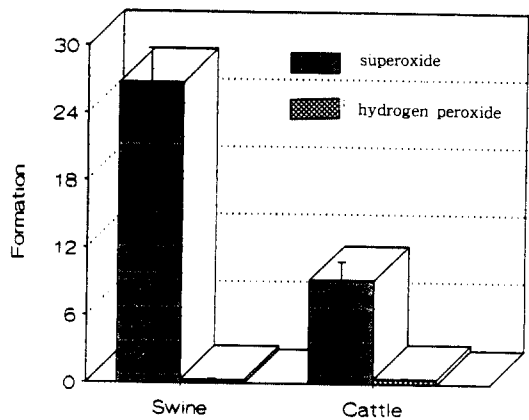


Fig 8. Formation of reactive oxygen species from hepatic microsomes of swine and cattle.
superoxide : nmole/mg/min.
hydrogen peroxide : nmole/mg/10min.

활성산소의 생성량과 항산화 효소의 활성 비교 : Superoxide, hydrogen peroxide 등의 활성산소들의 생성량과 이들을 제거하는 효소인 SOD와 catalase의 활성도는 Fig 8 및 9와 같다. Fig 8에서와 같이 한우의 간 마이크로솜에서 superoxide 생성량은 $9.22 \pm 1.65 \text{ nmole}$ 인 반면에 돼지는 $26.7 \pm 3.1 \text{ nmole}$ 로 한우에 비해 돼지가 높은 값을 나타내었으나($p < 0.01$) hydrogen peroxide는 한우가 $0.46 \pm 0.04 \text{ nmole}$, 돼지가 $0.32 \pm 0.09 \text{ nmole}$ 로 오히려 한우가 높은 값을 보여주었다($p < 0.05$). 그리고 이들 활성산소의 제거 효소중 superoxide를 제거하는 SOD의 활성도는 한우가 $7.64 \pm 0.84 \text{ unit}$ 이고, 돼지가 $4.47 \pm 0.93 \text{ unit}$ 로서 한우가 높았고($p < 0.05$), hydrogen peroxide를 제거하는 catalase의 활성도는 한우가 $30.4 \pm 3.7 \text{ unit}$ 이고, 돼지가 $17.2 \pm 1.8 \text{ unit}$ 로서 돼지에 비해 한우가 더 높은 활성을 나타내었다($p < 0.05$).

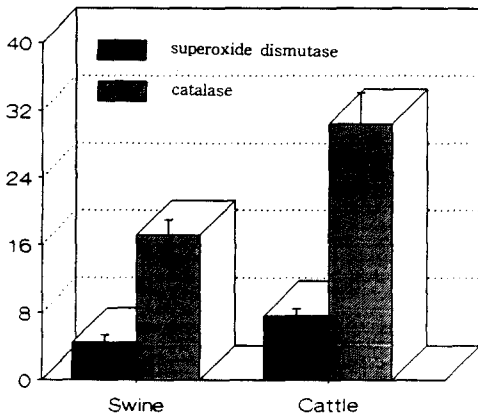


Fig 9. Activities of superoxide dismutase and catalase in hepatic cytosols from swine and cattle.
 superoxide dismutase : U/mg protein,
 catalase : U/mg protein.

고 찰

약물대사에 관여하는 효소들의 종간 특성을 이해함으로써 종에 따른 약물의 용량결정과 안전성의 평가 뿐 아니라 가축산물인 식육, 계란 및 우유 등에서의 약물잔류를 예측할 수 있다. 동물의 종에 따라 약물대사 경로 및 대사능은 매우 큰 차이를 보이고 있으므로 다른 종 동물에서 수행된 대사연구를 표적동물에 적용시킬 경우 예

상하지 못하는 오류를 범할 수 있다.

Mixed function oxidase(MFO)는 기질에 산소를 부가하는 산화반응을 포함하여 탈알킬 반응, 에폭시화 반응, 산화성 탈아민 반응, 탈황 반응, 탈할로겐 반응, 수산화 반응 등 다양한 산화반응을 촉매하는 효소계로서 분자상의 산소로부터 한 원자의 산소는 기질에 다른 한 원자는 물을 생성하는 반응을 촉매하므로 혼합기능 산화효소계라고 불리워지고 있다. 이 MFO system은 생체내 도입된 대부분의 약물을 대사하는데 있어 일차적 역할을 수행하며 뿐만아니라 생체내 정상 내인성 물질(지방산, 스테로이드 호르몬 등)의 산화에도 중요한 역할을 한다³¹. MFO system이 내·외인성 물질을 대사하기 위해서는 두개의 전자전달계 즉, P-450/P-450 reductase와 b_5/b_5 reductase를 필요로 하고 있는데 이중에서 P-450이 중추적인 역할을 한다. P-450은 많은 종류의 isozyme으로 구성되어 있으며, isozyme들의 조성에 의해 약물대사 경로와 대사산물의 종류가 달라지게 된다. 일반적으로 약물은 대사되어 약리작용 또는 독작용이 감소되는 것으로 알려져 있으나 어떤 물질은 대사되어 더욱 약리작용이 증강되는 것(prodrug)도 있으며, 또 parathion 같이 독작용이 증강되는 것도 있다³². 이와같이 대사에 의해 약물의 작용이 변화됨을 고려할 때, 동물의 종에 따른 대사작용의 변화와 P-450 isozyme들의 특성을 파악하는 것은 약리학 및 독성학적인 관점에서 매우 중요하다고 볼 수 있다.

약물대사에서 가장 중요한 역할을 하는 간장의 P-450의 함량을 측정된 결과에 의하면 돼지에서는 단백질 mg당 $0.35 \pm 0.03 \text{ nmole}$ 이었고, 한우에서는 $0.28 \pm 0.05 \text{ nmole}$ 로서 돼지가 한우보다 1.25배 높았으나 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 Smith *et al*³³이 Hereford x Angus 교배종(소)에서 측정된 P-450 함량은 $0.54 \pm 0.04 \text{ nmole}$, 돼지는 $0.30 \pm 0.04 \text{ nmole}$ 로서 소가 높았으며, 또한 면양은 $0.49 \pm 0.05 \text{ nmole}$ 이었다. 그런데 Winsnesky *et al*³⁴이 소와 양에서 각각 측정된 바에 의하면 소가 0.40 nmole , 면양이 0.60 nmole 으로 Smith *et al*³³의 보고와는 상반된 결과였다. 이와같이 보고자에 따라 서로 상이한 결과가 나타난 것은 MFO system의 수준이 연령, 품종, 식이 등의 차이에 기인된 것으로 생각된다. 특히 우리나라의 기후조건 및 사육환경에서 유래된 돼지와 한우가 외국의 것에 비해 다소 낮은 것은 사료의 조성차이, 사육 항생제 및 구충제 등의 종류와 사용량의 차이에 기인

할 수 있을 것으로 생각된다. P-450 reductase의 활성도는 돼지가 58.3 ± 5.3 unit이었으며, 한우는 29.9 ± 3.8 unit로서 돼지가 약 2배 높은 것으로 나타났다($p < 0.01$).

Cytochrome b_5 와 NADH b_5 reductase의 활성도는 돼지와 한우가 각각 0.20 ± 0.02 nmole, 0.24 ± 0.06 nmole 그리고 2.70 ± 0.41 nmole, 2.73 ± 0.28 nmole의 값을 나타내어 P-450의 경향과는 상반되었으나 유의성은 인정할 수가 없었다. 한편 P-450 의존성 monooxygenase의 활성도는 P-450의 isozyme에 따라서 특이하게 변화되기 때문에 isozyme의 조성을 예견할 수 있는 지표로 사용되고 있으며, 또한 다양한 약물 및 독성물질의 생체내 운명을 유추할 수 있다. P-450의 isozyme중 P-450b는 benzphetamine에 대해, P-450c는 benzo(a)pyrene이나 ethoxycoumarin, ethox-yresorufin 등에 대해, P-450j는 aniline에 대해 높은 기질 특이성을 띠므로 이러한 성질을 이용하여 P-450의 동위 효소 특성을 연구할 수 있다. 최근 이러한 P-450 isozyme의 명명상 혼란을 막기 위하여 이들을 생성하는 유전정보를 가지는 DNA의 특성을 고려하여 새로운 명명법이 제기되고 있다. P-450 IA1의 지표효소³⁵인 ECOD의 활성도는 돼지와 한우에서 각각 27.9 ± 4.4 nmole, 24.5 ± 2.9 nmole로서 두 종간에 큰 차이가 없었다. 그러나 P-450 IA1의 또 다른 지표효소인 EROD의 활성도는 한우에서 96.5 ± 12.5 nmole 그리고 돼지에서 13.6 ± 2.1 nmole로서 한우가 돼지보다 5~10배 높은 활성을 나타내었다($p < 0.01$). 따라서 치료약제의 사용 및 잔류대책에 이와같은 특성 즉, 같은 type의 isozyme이라도 동물의 종에 따라 미물질 대사의 활성이 크게 다르다는 점을 고려해야 하는 것을 시사해 주었다. P-450 IIB1의 지표효소³⁵인 BPDm의 활성도는 한우가 2.23 ± 0.82 nmole, 돼지가 0.76 ± 0.30 로서 3배 높은 값을 나타냄을 확인하였는데($p < 0.01$), 이것은 Smith *et al*³³의 보고와 일치하였다. 그러나 동 연구자 등이 P-450의 함량이 소가 돼지보다 높다고 한 점 등을 생각해볼 때, 본 실험에서 사용한 돼지의 P-450의 phenotype에 차이가 있을 것으로 생각된다. P-450 IIE의 지표효소인 AH의 활성도도 한우(0.95 ± 0.21 nmole)가 돼지(0.33 ± 0.08 nmole)보다 3배 높은 값을 나타내었으며($p < 0.01$), 스테로이드 호르몬을 대사시키는 효소인 TST-hydroxylase 활성도에서도 비슷한 경향을 보였다($p < 0.01$). 스테로이드 호르몬중 TST는 간의 MFO system에 의해 산화되어 다양한 대사산물을 생성하여 각 P-450 동위효소 활성에 따라 특이적인 monohydroxy TST이 생성되기

때문에 P-450의 특성연구에 가장 유용하게 이용된다. 본 실험에서도 11종류의 대사산물이 HPTLC plate상에 나타났지만 그중 표준물질이 확보된 6종에 대해 확인할 수 있었다. 돼지에서 현저히 높은 TST 7 α -hydroxylase의 활성도는 연령이 증가함에 따라 감소한다는 보고가 있어 종간비교시 상대적인 연령이 고려되어야 할 것으로 생각된다. 그리고 P-450 IIIA의 지표효소인 TST 6 β -hydroxylase와 TST 16 β -hydroxylase의 활성도는 한우가 현저히 높은 값을 나타내어($p < 0.01$), 호르몬의 대사에 있어서 같은 응성임에도 종차가 뚜렷하다는 것을 보여주었다. 또한 P-450 IIB의 지표효소인 TST 16 α -hydroxylase의 활성도는 한우와 돼지 모두 검출되지 않았다. 그러나 Chantael *et al*³⁶의 보고에 의하면 흰쥐에서는 TST 16 α -hydroxylase의 활성도가 가장 높고, TST 7 α -hydroxylase의 활성도가 가장 낮아, 본 실험에서 얻은 한우와 돼지의 효소들과는 많은 차이가 있음을 알 수 있었다.

반응성이 큰 활성산소(reactive oxygen species)는 생체 성분을 쉽게 산화시킬 수 있는 특징을 가지고 있다. 생리적으로 주요한 활성산소종으로 superoxide radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxy radical(OH \cdot), singlet oxygen(¹O₂) 등³⁷이 있다. 이들 활성산소종은 약물대사에 관여할 뿐만 아니라 생리적으로 prostaglandin의 합성, 백혈구의 탐식작용 등을 수행하기도 하지만 생체성분의 산화적 손상(oxidative damage)을 야기시킬 수도 있다³⁷. 활성산소종의 1차적인 공격대상은 지질, 단백질, 핵산 등이며, 특히 MFO system 또한 막에 존재하기 때문에 마이크로솜의 막지질이 손상을 받게 되면 결과적으로 P-450, P-450 reductase, b_5 , b_5 reductase 등이 손상받게 되어 이 효소계의 활성도가 저하하게 된다. 뿐만 아니라 활성산소는 여러가지 다른 효소단백질의 성상을 변화시키고 암, 동맥경화증, 자기면역질환, 관절염, 폐질환, 당뇨병, 각종 기관의 허혈증, 신경질환 등 많은 질환의 발병과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다³⁵. 그러나 생체는 이러한 유해산소종에 대한 자가방어 기전을 가지고 있어 스스로를 보호하고 있다. 항산화 효소는 대표적인 방어기전에 관련요소로서 대부분의 조직에 널리 분포되어 있고, 특히 세포내에 존재하는 것으로는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등이 있다³⁸.

한편 P-450에 의한 정상적인 대사과정 중에서도 활성산소들이 생성되며, 반응하는 기전에 따라서 hydrogen peroxide의 생성량이 증가 또는 감소된다는 보고가 있으

며 뿐만 아니라 활성산소의 생성량과 막지질의 과산화와도 비례하지 않아 이에 대한 연구가 앞으로 계속되어야 할 것이다. 현재까지 한우와 돼지의 간 마이크로솜에서 생성되는 활성산소종의 생성량과 이들을 제거하는 항산화효소의 활성도에 대한 보고는 없으며, 가축을 대상으로 한우 활성산소종 및 항산화제에 대한 연구도 미진한 상태이다. 본 실험에서 간 마이크로솜에서의 superoxide 생성은 돼지가 한우보다 현저하게 높았으나 hydrogen peroxide는 한우가 다소 높았다. 그 밖의 항산화 작용을 하는 sulfhydryl 화합물의 함량은 돼지가 높았으며, GSH redox cycling에 관여하는 효소들중에 GSH reductase 활성도는 한우가 높게 나타났다.

Phase II 반응에 관여하는 GSH S-transferase의 활성도는 돼지가 한우보다 유의하게($p < 0.01$) 높은 값을 나타내었으며, 이러한 결과는 Smith *et al*³³이 보고한 것과 유사하였다. 한편 Gregus *et al*³⁹에 의해 흰쥐, 마우스, 기니피그 등의 소동물에서 측정된 GSH-S-transferase의 활성도는 대동물인 돼지 및 한우에 비해 2,000 단위 이상 상회하는 실험결과를 보고한 바 있다. 이 결과를 종합해보면 소보다는 돼지가, 돼지 보다는 더 작은 소동물이 즉, 체중에 비해서 체표면적이 넓은 소동물⁶¹에서 이 효소의 활성도가 높다는 것을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 P-450의 함량은 한우보다 돼지가 다소 높았으나 P-450 isozyme중 P-450 IA1이나 P-450 IIIA의 상대적인 함량은 한우가 오히려 높았으며, 한우는 활성산소의 생성은 적은 반면 제거효소의 활성은 높음을 알 수 있었다.

결 론

우리나라 재래종인 한우와 잡종 돼지(Landrace x Yorkshire)에서 약물대사에 중추적인 역할을 하는 간 마이크로솜의 cytochrome P-450의 함량과 이에 관련된 효소들의 활성도 및 세포질에 위치하는 항산화효소의 활성도를 측정하였다. 한우와 돼지의 간 마이크로솜에서 cytochrome P-450의 함량은 0.28 ± 0.05 nmole/mg과 0.35 ± 0.03 nmole/mg로 차이는 인정되지 않았다. 한우에서 cytochrome b₅의 함량은 0.24 ± 0.06 nmole/mg이었으며, 돼지는 0.2 ± 0.05 nmole/mg로 두 종 사이에 차이점은 발견할 수 없었다. NADPH P-450 reductase는 한우(58.3 ± 5.3 nmole/mg/min)가 돼지(29.9 ± 3.8 nmole/mg/min)에 비하여 높은

활성이 인정되었다($p < 0.01$). Ethoxyresorufin O-deethylase (한우, 96.5 ± 12.5 nmole/mg/min; 돼지, 13.6 ± 2.1 nmole/mg/min)와 N-benzphetamine N-demethylase, (한우, 5.23 ± 0.82 nmole/mg/min; 돼지, 0.76 ± 0.3 nmole/mg/min) 그리고 aniline hydroxylase (cattle, 0.95 ± 0.1 nmole/mg/min; pigs, 0.33 ± 0.08 nmole/mg/min)의 활성도는 한우가 돼지보다 높은 것으로 나타났다($p < 0.01$). Testosterone 7 α -hydroxylase의 활성도는 돼지(90.4 ± 1.2 nmole/mg/min)가 한우(32.8 ± 1.2 nmole/mg/min) 보다 높게 나타났다($p < 0.01$). 특이한 것은 P-450 IIA의 지표효소인 testosterone 16 α -hydroxylase는 한우와 돼지 모두에서 검출되지 않았다. 이러한 사실은 한우와 돼지에서 cytochrome P-450의 P-450 IA1과 P-450 IIIA isozyme의 함량이 상대적으로 높다는 것을 암시한다. 총 sulfhydryl 화합물 (한우, 10.3 ± 1.1 nmole/mg; 돼지, 14.5 ± 1.8 nmole/mg)과 glutathione reductase(한우, 38.1 ± 7.9 nmole/mg/min; 돼지, 22 ± 3.6 nmole/mg/min)을 제외한 glutathion 관련효소의 활성도는 한우보다 돼지에서 높았다($p < 0.01$). Superoxide와 hydrogen peroxide의 생성량은 한우가 돼지보다 높았다($p < 0.05$). Superoxide dismutase(한우, 7.64 ± 0.84 nmole/mg/min; 돼지, 4.47 ± 0.94 nmole/mg/min)($p < 0.05$)와 catalase(한우, 30.4 ± 3.7 nmole/mg/min; 돼지, 17.2 ± 1.8 nmole/mg/min)는 한우가 돼지보다 높은 값을 보여주었다($p < 0.05$).

참 고 문 헌

1. Brodie BB, Axelord J, Cooper JR, *et al*. De-toxification of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 121:603-604, 1955.
2. Klooster Van't GAE, Wountersen-van NFMA. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of ethylmorphine and its metabolism in microsomal incubations and cell culture media. *J Chromato Biochem Appl*, 579:158-164, 1992.
3. Bock KW, Lilienblum W, Fischer G, *et al*. Induction and inhibition of conjugating enzymes with emphasis on UDP-glucuronyltransferases. *Pharm Ther*, 33:23-27, 1987.
4. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem*, 239:2379-2385,

- 1964.
5. Guengerich FP. Isolation and purification of cytochrome P-450 and the existence of multiple forms. *Pharm Ther* , 6:99-121, 1979.
 6. Cooper DY, Levin S, Narasimulu S. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* , 147:400-402, 1965.
 7. Hyrery EG, O'Brieb PJ. The peroxidase nature of cytochrome P-450 utilizing a lipid peroxide substrate. *Arch Biochem Biophys* , 147:28-35, 1971.
 8. Iio T, Yoden K. Fluorescence formation and heme degradation at different stages of lipid peroxidation. *Life Sci* , 40:2297-2302, 1987.
 9. Bast A, Brenninkmeijer JW, Savenije-Chapel EM. Cytochrome P-450 oxidase activity and its role in NADPH dependent lipid peroxidation. *FEBS Letters* , 151:1983-1988, 1983.
 10. De Groot H, Sies H. Cytochrome P-450, reductive metabolism and cell injury. *Drug Metabol Rev* , 20: 275-284, 1989.
 11. Guengerich FP. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Research* , 47:2946-2954, 1988.
 12. Gelboin HV. Benzopyrene metabolism, activation and carcinogenesis : role and regulation of mixed function oxidase and related enzymes. *Physiol Rev* , 60:1107-1166, 1980.
 13. Bansal SK, Love J, Gurtoo HL. High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* , 117: 268-274, 1983.
 14. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AB. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* , 193:265-275, 1951.
 15. Williams CH, Kamin, M. Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J Biol Chem* , 237:587-595, 1962.
 16. Mihara K, Sato R. Partial purification of NADH cytochrome b₅ reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J Biochem* , 71:725-735, 1975.
 17. Greenlee WF, Poland A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin. *J Pharm Exp Ther* , 205:596-605, 1978.
 18. Burke MD, Prough RA, Mayer RT. Characteristics of a microsomal cytochrome P-448-mediated reaction ethoxyresorufin O-deethylation. *Drug Metab Disp* , 5: 1-8, 1978.
 19. Thomas PE, Lu AYH, Ryant D, et al. Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. Immunological evidence with antibody against cytochrome P-450. *J Biol Chem* , 251:1385-1391, 1976.
 20. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J* , 55: 416-420, 1953.
 21. Peter OJ, Rahimtula AD. Assay for aniline hydroxylase. *Methods Enzymol* , 52:407-412, 1978.
 22. Lee DW, Park KH. Testosterone metabolism by microsomal cytochrome P-450 in liver of rats treated with some inducers. *Intl J Biochem* , 21:49-57, 1989.
 23. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* , 249:7130-7139, 1974.
 24. Flohe L, Gunzer WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* , 105:114-121, 1984.
 25. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein bound and non-protein bound sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagents. *Anal Biochem* , 25:192-205, 1968.
 26. Racker E. Glutathione reductase from baker's yeast and beef liver. *J Biol Chem* , 217:855-865, 1955.
 27. Aust SD, Roerig DL, Pederson TC. Evidence for superoxide generation by NADPH cytochrome C reductase of rat liver microsome. *Biochem Biophys Res Commun* , 47:1133-1137, 1972.
 28. Alfred G, Roots H, Tjoe M. Hydrogen peroxide in hepatic microsomes. *Methods Enzymol* , 52:342-350, 1978.
 29. McCord JR, Colby MD, Fridovich I. Superoxide dismutase, enzymatic function for erythrocyte

- (chemocuprein). *J Biol Chem* , 231:6049-6055, 1972.
30. Aebi H. Catalase. In Bergmeyer H, Bergmeyer J, Grad M. ed *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed, Verlag Chemie, Weinheim:3, 273-286, 1983.
 31. Lee DW. Oxidative stress and age-related changes in microsomal mixed function oxidase activity. *Kor J Geron* , 2:187-201, 1991.
 32. Brown VK. *Acute toxicity in theory and practice*. Preface Ltd., Salisbury, Wilts and Printed by Pay Bros (Norwich) Ltd., Norwich, 6-32, 1980.
 33. Smith GS, Watkins JB, Thompson TN. Oxidative and conjugative metabolism of xenobiotics by livers of cattle, sheep, swine and rats. *J Anim Sci* , 58:386-395, 1984.
 34. Winsnesky JA, Moody DE, Hammock BD. Interlobular distribution hepatic xenobiotic metabolizing enzyme activities in cattle, goats and sheep. *J Anim Sci*, 64:210-213, 1987.
 35. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA*, 10:1-14, 1991.
 36. Chanteal C, Simone C, Thierry C. Alteration of cytochrome P-450 2C11-dependent testosterone metabolism in Gunn rat liver. *Biochemica Biophysica Acta* , 1156:15-18, 1992.
 37. Halliwell B, Aruoma OI. *DNA and Free Radical*, Ellis Horwood Ltd., Market Cross House, Cooper Street, Chichester, West Sussex, PO19 1EB, England, 19-161, 1993.
 38. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* , 140:531-554, 1989.
 39. Gregus Z, Watkins JB, Thompson TN. Hepatic phase I and phase II biotransformation in quail and trout: Comparison to other species commonly used in toxicity testing. *Toxicol Appl Pharm* , 67:430-441, 1983.