Kor. J. Food Hygiene 5(4), 237-242 (1990)

Streptozotocin에 의한 lipid peroxidation 측정시 TBA법의 적합성에 관한 연구

정진호 · 호지숙 · 문창규
서울대학교 약학대학 위생약학실

Direct Interaction of Streptozotocin with TBA (thiobarbituric acid) in Lipid Peroxidation Analysis

Jin-Ho Chung, Ji-Sook Ho and Chang-Kiu Moon
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

ABSTRACT—This study was conducted to evaluate the usage of TBA method for the analysis of lipid peroxidation induced by streptozotocin. 5 mM streptozotocin and 1% TBA alone showed the maximum peak at 309 nm and 358 nm respectively, although no peak was observed at 532 nm which was the wavelength to determine the absorbance for TBA method. When 5 mM streptozotocin was mixed together with 1% TBA *in vitro*, new peaks at 439 nm and 532 nm had been detected, suggesting TBA did interact directly with streptozotocin forming new colored products.

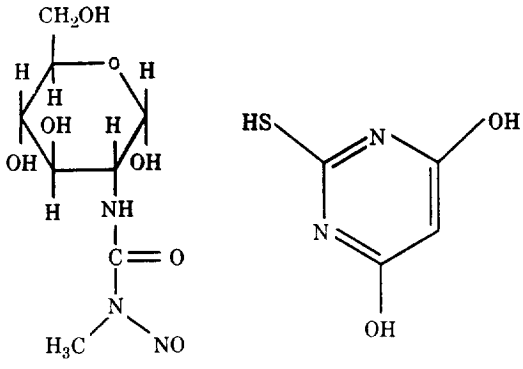
These results suggest that TBA method is not adequate for determination of lipid lperoxidation induced by streptozotocin.

Keywords□Streptozotocin, Lipid peroxidation, TBA method, Diene conjugation.

Streptozotocin은 *Streptomyces achromogenes*균의 배양에 의한 분리된 nitrosourea계열의 화합물로서 췌장암에 대한 항암제로 사용되고 있으며,[1] 1963년 streptozotocin이 rat와 dog에서 당뇨병을 유발한다고 보고된 이래, 실험동물에서 당뇨병을 유도하기 위한 약물로 널리 사용된다.[2,3] 당뇨병을 유발하는 기전은 아직 불분명하지만 췌장의 beta-cell에 대한 특이한 독성때문인 것으로 믿어진다. Streptozotocin의 구조는 2-deoxy-2(3-methyl 3-nitrosoureido)-D-glucopyranose로서(Fig. 1) 그 nitroso moiety는 췌장세포 독성을 매개하며, deoxyglucose moiety는 beta-cell로의 유입을 용이하게 한다.[4] Streptozotocin은 세포내에서 alkylation 및 radical attack 등을 통한 DNA 손상을 일으켜 poly ADP-ribose polymerase의 활성을 증가시키기 때문에 세포내의 NAD^+ 함량을 낮추며,[5,6,7] 또한 superoxide dismutase activity를 현저히 감소시킨다.[8] 따라서 당뇨병을 유발하는 기전은 alkylation이나 radical attack으로 인한 DNA 손상 및 그로인한 NAD^+ depletion으로 추정되고 있다.[9]

생체막의 과산화 지질(lipid peroxidation)은 radical attack으로 인해 발생하는 대표적인 세포손상이다. 생체막을 구성하는 인지질은 arachidonic acid와 같은 polyunsaturated fatty acid를 많이 함유하는데, 이들은 free radical에 의해 hydrogen abstraction을 받는다. 이로 인한 double bond의 shift로 conjugated dienes을 형성하며, 생성된 organic radical은 산소와 반응하여 peroxy radical(ROO)을 만든다. 이것은 다시 hydrogen abstaction 반응을 거쳐 hydroperoxide로 변하며 결과적으로는 malonic dialdehyde

Received for Publication 29, November, 1990
Reprint request: Dr. J.H. Chung at the above address



STZ TBA

Fig. 1. Structures of streptozotocin (STZ) and thiobarbituric acid (TBA).

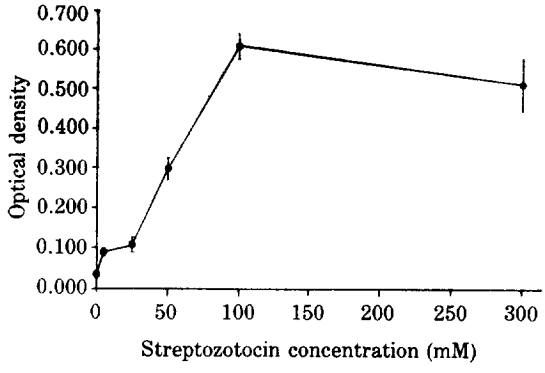


Fig. 2. Effect of streptozotocin on lipid peroxidation of RBC *in vitro*.
4 m*l* of 20% RBC suspensiion was incubated with various doses of streptozotocin for 2 hours. Membrane lipid peroxidation in RBC was determined by TBA method

(MDA), ethane, pentane 등을 생성한다.[10]

따라서 lipid peroxidation을 측정하는 대표적인 방법으로는 233 nm에서 conjugated dienes을 직접 측정하는 방법과 생성된 MDA를 thiobarbituric acid와 산성 조건하에서 반응시켜 함께 가열한 후 532 nm에서 그 흡광도를 측정하는 TBA 방법이 있다.

본 실험에서는 streptozotocin으로 유도된 적혈구 막의 lipid peroxidation에 관한 연구를 수행하던 중 streptozotocin은 TBA method의 간섭물질로 작용한다는 것을 관찰하였다. 따라서 본 연구에서는 streptozotocin과 TBA를 직접 반응시켜, streptozotocin이 TBA method에 어떤 영향을 미치는가를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

적혈구 막의 lipid peroxidation측정 – 20%의 적혈구 현탁액 4 m*l*를 0, 5, 25, 50, 100, 300 mM의 streptozotocin 1 m*l*와 37℃에서 2시간동안 배양한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 phosphate-buffered saline(PBS : pH 7.4) 0.8 m*l*, BHT 0.025 m*l* 및 TCA 0.5 m*l*을 가하고 잘 섞어 ice에서 2시간동안 방치했다. 이것을 다시 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 1 m*l*을 취하고 0.1 M EDTA 0.075 m*l*, 1% TBA 0.25 m*l*를 넣고 100℃에서 15분간 가열한 후 shimadzu UV-2100을 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정했다.[11]

Streptozotocin과 TBA의 직접반응 – Streptozotocin (Sigma Co. USA) 26.52 mg을 cold saline 2 m*l*에 녹인 후 계대 희석하여 각 1, 5, 10, 25, 50 mM의 streptozotocin 용액을 만들었으며 1% TBA 용액은 TBA 1g을 0.05 N NaOH 용액 100 m*l*에 녹여 제조했다. 각 시험관에 1% TBA solution 1 m*l*, 0.5 N HCl 0.25 m*l*, streptozotocin 용액 1 m*l*를 가하여 잘 섞고 상기 측정방법과 동일하도록 100℃에서 15분간 가열하여 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5 mM streptozotocin 용액, 1% TBA 용액, 5 mM streptozotocin + 1% TBA 반응액에 대해 각각 spectrum을 찍었으며, streptozotocin과 TBA 혼합 반응에 의해 생긴 peak 439 nm와 TBA method에서의 측정파장인 532 nm에서 streptozotocin 농도에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

결론 및 고찰

본 연구에서는 TBA법에 미치는 streptozotocin의 영향을 관찰하였다.

Streptozotocin에 의한 적혈구 막의 lipid peroxidation을 측정하기 위해 시험관에서 streptozotocin과 적혈구를 함께 배양한 후 원심분리하여 medium상의 streptozotocin을 제거하고 packed RBC를 분리하여 lipid peroxidation을 TBA법으로 측정하였다. Lipid

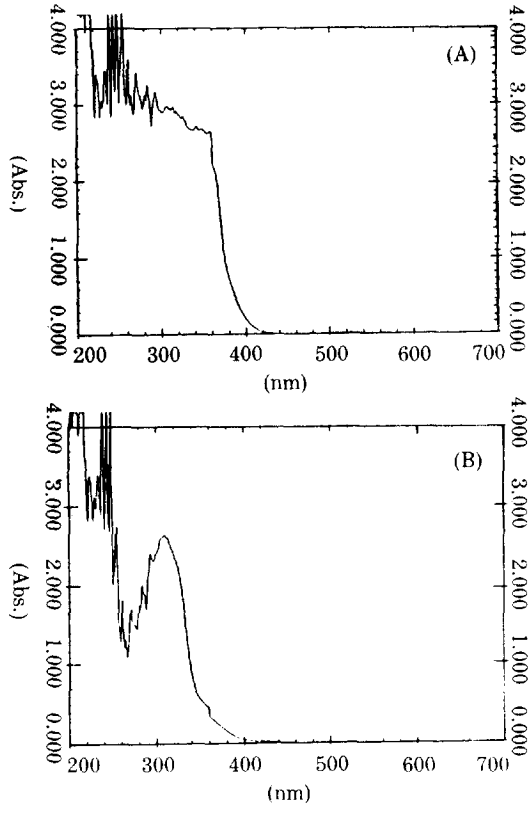


Fig. 3. Spectrums of 1% TBA solution (A) and 5 mM streptozotocin solution (B).

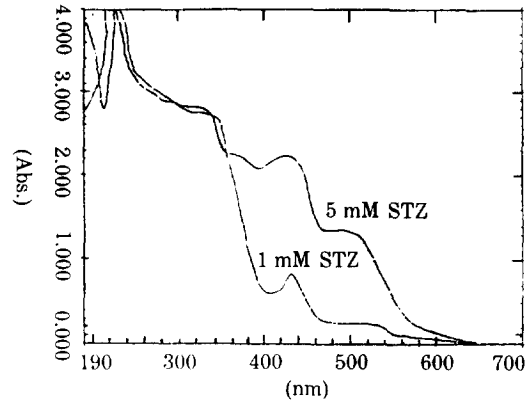


Fig. 4. Spectrums of mixtures of streptozotocin (STZ) and 1% TBA solution.

Table 1. Optical densities of colored products of various concentrations of streptozotocin and 1% TBA solutions at 439 nm and 532 nm

Streptozotocin conc. (mM)	Absorbances 439 nm	532 nm
0	0	0
1	0.850	0.147
5	2.211	1.112
10	2.267	2.067
25	2.272	2.239
50	2.223	2.204

peroxidation은 streptozotocin의 농도에 따라 현저히 증가하다가 100 mM streptozotocin에서 plateau를 이루었다 (Fig. 2). 그런데 이상의 실험과 병행한 streptozotocin만의 대조실험에서 streptozotocin만으로도 시험관에서 TBA와 가열시 주황색의 물질을 생성하는 것을 관찰하였다.

5 mM streptozotocin과 1% TBA 각각의 spectrum을 시험관 내에서 측정하여 보면 309 nm, 358 nm에서 최대흡수를 나타내는 것을 알 수 있다 (Fig. 3). 그러나 TBA법의 측정파장인 532 nm에서는 전혀 흡수가 일어나지 않았다. 한편, 5 mM streptozotocin과 1% TBA 용액을 상기 조건하에서 반응시킨 후 spectrum을 찍어본 결과 439 nm와 532 nm에서 새로운 흡수가 생겼다 (Fig. 4). 따라서 streptozotocin은 화합물 자체가 TBA와 결합하여 흡광을 나타내기 때문에 streptozotocin에 의한 lipid peroxidation 측정은 TBA method을 사용할 수 없음을 제시하고 있다. Table 1에서는 1% TBA 용액을 여러 농도의 streptozotocin과 반응시켜 439 nm 및 532 nm에서의 흡광변화를 측정한 결과 10 mM까지는 농도에 비례하다가 25 mM부터는 plateau가 됨을 보여준다. 이것은 발색단의 생성이 사용된 산의 종류와 강도, 그리고 가열시간에도 의존하기 때문인 것 같다.

TBA법은 지방산, 생체막, 식품 등의 지질과산화를 측정하기 위하여 가장 빈번히 사용되는 방법이다. 이 방법은, 시료를 산성 조건하에서 thiobarbituric acid와 함께 가열하여 생성된 주황색을 532 nm에서 측정하는 매우 간단한 방법이다. 대부분의 막구조에서는 lipid peroxidation이 진행되는 동안 malondialdehyde(MDA)가 생기는데,[10] 이 MDA와 TBA의 반응에 의해 생긴 발색단의 흡광도를 lipid peroxidation의 지표로 삼는다.

그러나, MDA외의 다른 물질, 예를 들면 biliverdin,

glyoxal, acetaldehyde-sucrose, β-formyl pyruvic acid 등이 TBA와 함께 가열시 532 nm 근처에서 흡광을 나타낸다. 그 외에도 탄수화물, 아미노산, 지질, 핵산중의 일부가 직접 TBA와 반응할 수 있다.[12] 이러한 TBA의 비특이적 반응 때문에 lipid peroxidation측정에 TBA method를 이용한 경우에는 세밀한 주의가 필요하다. Strepozotocin의 어떤 구조가 TBA와 반응성을 나타낼지는 현재 확인되지 못했지만, nitrosourea만 함유한 항암제 carmustine (BCNU ; 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea)의 경우 TBA method에 간섭이 없는 것으로 보아 deoxyglucose기가 TBA와 반응성을 나타낼 지 모른다 (Fig. 1).

Fig. 2의 실험에서 medium상의 streptozotocin은 제거했지만 세포안으로 수송된 streptozotocin은 제거하지 못했으므로 그대로 시험관에 잔존하게 된다. 그리고 streptozotocin과 TBA의 반응은 매우 저농도 (1 mM)에서도 이루어지므로(Fig. 4) 세포내에 남아 있는 streptozotocin은 TBA method에 의한 lipid peroxidation 측정에 영향을 줄 것으로 보인다.

TBA method외에 많이 이용되는 측정법인 diene conjugation은 lipid peroxidation에서 생성된 conjugation diene이 233 nm에서 빛을 흡수하는 것을 이용한다. nonconjugated double bond를 가진 lipid는 보통 225 nm이하에서만 흡수를 나타내므로 그 difference spectrum을 지표로 삼는다.[13] 그러나 streptozotocin도 200 nm-300 nm에서 흡수를 나타내므로 (Fig. 3) 이 방법도 streptozotocin에 의한 lipid peroxidation을 측정하기에는 부적당한 것 같다.

이러한 결과들을 종합해 볼 때, streptozotocin으로 인한 적혈구 막의 과산화 지질은 TBA method 및 diene conjugation 방법으로는 측정할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 다른 방법, 즉 oxygen uptake 측정법 및 ethane 또는 penthane의 측정법 등을 재고해야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 1989년도 한국과학재단 목적기초 연구비에 의해 이루어졌습니다.

국문요약

Streptozotocin에 의한 적혈구 막의 lipid peroxidation 측정시 TBA법의 적합성에 관하여 검토하기 위하여 streptozotocin와 TBA의 직접반응 여부를 연구하였다.

여러 농도의 Streptozotocin와 20% RBC suspension을 함께 배양한 후 lipid peroxidation을 TBA법으로 측정했을때, streptozotocin의 농도에 따라 흡광도가 증가하다가 100 mM부터는 plateau를 이루었다. 그런데 적혈구를 제거한 대조실험에서도 발색단이 관찰되었다. 시험관에서 5 mM의 streptozotocin와 1% TBA를 산성조건에서 가열 직접반응시킨 후 spectrum을 찍은 결과, TBA법 측정파장인 532 nm에서 새로운 peak가 생겼다. 또 이 파장에서의 흡광도는 streptozotocin 농도에 따라 증가하다가 25 mM부터는 plateau가 되었다. 이러한 결과들은 적혈구와 streptozotocin를 함께 배양하여 lipid peroxidation을 측정할 때, cell내로 유입된 streptozotocin가 TBA와 직접반응을 할 수 있음을 제시한다. 그리고 다른 측정법인 diene conjugation은 233 nm에서의 흡수를 측정하는데, streptozotocin 자체가 200-300 nm에서 흡수를 나타내므로 이 방법으로도 lipid peroxidation 측정을 방해할 수 있다. 따라서, streptozotocin에 의한 적혈구막의 lipid peroxidation은 TBA method 및 diene conjugation 방법으로 측정하기는 부적합한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Weiss, R.W. Streptozocin: Review of its pharmacology, efficacy, and toxicity, *Cancer Treatment Reports*, **66**, 427 (1982).
2. Junod, A. and Lambert, A.E. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **126**, 201 (1967).
3. LeMarchand-Brustel, Y. and Freychet, P. Effect of fasting and streptozotocin diabetes on

insulin binding and action in the isolated mouse soleus muscle. *J. Clin. Invest.*, **64,** 1505 (1979).
4. Rossini, A.A., Like, A.A., Dulin, W.E. and Cahill, G.F. Pancreate beta cell toxicity by streptozotocin anomers. *Diabetes*, **26,** 1120 (1977).
5. Dulin, W.E. and Wyse, B.M. Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. *Diabetes*, **18,** 459 (1969).
6. LeDoux, S.P., Hall, C.R. and Forbes, P.M. *et al.* Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozotocin toxicity. *Diabetes*, **37,** 1015 (1988).
7. Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthase in pancreatic islets. *Nature*, **294,** 284 (1981).
8. Wilson, G.L., *et al.* Mechanism of streptozotocin and alloxan induced damage in rat β-cells. *Diabetologia*, **27,** 587 (1984).
9. Papaccio, G., Pisanti, F.A. and Frascatore, S. Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes*, **35,** 470 (1986).
10. Halliwell,B. and Gutteridge, J.C.M. in "Free Radicals in Biology and Medicine", 2nd ed., pp. 188-210, Clarendon Press, Oxford, (1989).
11. Jain, S.K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.*,**264,** 21340 (1989).
12. Halliwell, B. and Gutteridge, J.C.M. in "Free Radicals in Biology and Medicine", 2nd ed., pp. 228-233, Clarendon Press, Oxford, (1989).
13. Gutteridge, J.C.M. and Smith, A. Antioxidant protection by hamopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem. J.*, **256,** 861 (1988).