大韓獸醫學會誌(1996) 第36卷 第4號
Korean J Vet Res(1996) 36(4) : 809~819

배양세포주(MDBK cell)내에 caffeine, 철분 및 vitamin E 혼합처리시 배양시간 경과에 따른 지질과 단백질 구성성분의 변화

도 재 철 · 허 린 수*

경상북도가축위생시험소
경북대학교 수의과대학*
(1996년 5월 16일 접수)

Changes of the lipid and protein components according to the time lapsed after combined treatment of caffeine, iron and vitamin E in MDBK cells

Jae-cheul Do, Rhin-sou Huh*

Kyungpook Veterinary Service Laboratory
*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University**
(Received May 16, 1996)

Abstract : This study was conducted to identify the effects of caffeine or combinations of caffeine and iron or vitamin E on the lipid and protein components in the MDBK(Mardin-Darby Bovine Kidney) cells.

For the *In vitro* test, MDBK cells in *a*-MEM(Minimum Essential Medium) were divided into 4 treatment groups according to drug types and dosages as follows; the control(group A), group B was treated with 0.3mM caffeine, group C was treated with 0.3mM caffeine and 0.3mM ferric chloride, group D was treated with 0.3mM caffeine and 0.3mM vitamin E. Those groups were further divided into 5 subgroups according to the time lapsed(control, 4hrs, 8hrs, 24hrs and 48hrs lapsed group).

The concentrations of the carbonyl group and malondialdehyde(MDA) and the patterns of the SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and fatty acid compositions were analyzed to determine the oxidative damages and metabolic changes on the lipid and protein components in the MDBK cells.

The results obtained from this study were summarized as follows;

1. The concentrations of carbonyl group and malondialdehyde in MDBK cells of group C were significantly higher($p<0.01$) in comparison to the control, and increased according to the

Address reprint requests to Dr. Jae-cheul Do, Kyung pook Veterinary Service Laboratory, Hakjung dong 859-3, Tae-gu 702-210, Republic of Korea.

time lapsed. But the results of groups B and D were little different in comparison to the group C.

2. As the analytical results of fatty acid compositions in MDBK cells, the proportions of palmitoleic acid and linoleic acid in groups B, C and D were lower in comparison to the control, while the proportion of arachidonic acid in groups B, C and D were significantly higher($p<0.01$) in comparison to the control.

3. In order to determine the oxidative damages to the protein in MDBK cells, the patterns of the SDS-PAGE were examined and the patterns of SDS-PAGE in groups C and D were significantly different between 43kd and 200kd of molecular weight.

Key words : MDBK cells, carbonyl group, malondialdehyde, fatty acid composition.

서 론

Caffeine(1,3,7-trimethylxanthine)은 여러 식물조직에 존재하는 alkaloid로서 커피, 홍차, 코코아, 쵸코렛과 콜라와 같은 여러 식품과 음료 등에 함유되어 있으며[1,7,14,16,33] 또한 caffeine은 동물조직에서 adenine과 guanine의 중간 대사산물로 생성되는 물질로서 동물체내에 투여시 다양한 약리작용과 더불어 탄수화물, 지질 및 아미노산 대사에 영향을 미치게 된다[5,16,23,33].

화학적으로 caffeine은 theophilline, theobromine 등과 함께 purine 유도체의 methylated xanthine으로서 동물의 소화장기에서 쉽게 흡수되어 oxidation, demethylation의 대사과정을 거쳐 주요 metabolite인 1-methylxanthine, 1-methyluric acid, 1,7-dimethylxanthine, 7-methylxanthine, 1,3-dimethyluric acid와 unchanged caffeine으로 오줌을 거쳐 배설되게 된다[12,34]. Caffeine은 강력한 중추신경계 흥분제로서 뇌의 운동신경 중추에 작용하여 조건반사와 근육활동을 항진시킴으로써 피로감을 줄여 주고 호흡 및 미주신경 중추를 자극하며 과량섭취시 strychnine convulsion과 유사한 경련을 유발하며[3,7,16,22], 신세뇨관에서 혈행의 증가와 수분흡수의 감소로 이뇨작용을 촉진시키는 등[5,13,31,40,41]의 다양한 약리작용을 함과 아울러 theophylline (1,3-dimethylxanthine)과 caffeine은 강력한 bronchodilator로서 asthma와 neonatal apnoea의 치료제로도 사용된다[16].

철분은 동물의 호흡작용에서 매우 중요한 hemoglobin과 catalase, peroxidase 등의 주요 구성성분으로서 여러 생명현상에 관여하는 주요 무기질중의 하나이며 또한 free radical 유도물질의 강력한 산화제로서 지방질의 과산화작용을 촉진시킨다[11,17]. 이러한 철분이 과량으로 투여되면 항산화제로 작용하는 vitamin E에 산화작용을 일으켜 tocopherylquinone으로 불활성화시켜 vitamin E의 결핍증세를 초래하며 적혈구막 및 세포막 지질에 결합된 다불포화지방산이 비효소성 과산화작용을 받아 그의 이중결합 부분이 절단되어 짧은 사슬의 thiobarbituric acid (TBA) 반응성 malondialdehyde 등의 지질과산화물이 많이 생성되어[6,15] 축적되며, 세포 또는 세포소기관의 지질과산화에 의해 mitochondria, microsome 등의 세포소기관 손상, 효소단백질중 아미노산 잔기의 산화 등을 일으키게 된다[37,39]. 최근에는 노화(aging)와 연관지어 free radical로 인한 과산화지질에 대한 많은 연구가 진행중이며 특히 과산화지질은 불포화지방산을 함유한 지질이 산소와 반응하여 생성되는 과산화물 구조를 가진 물질로서 hydroxyperoxide와 endoperoxide type로 구분하며, 이들이 생성되기 위해서는 산소나 불포화지방산중 어느 쪽이라도 활성화되어야 하는데 보통 불포화지방산이 활성화되려면 방사선, 자외선 등의 조사나 중금속 등의 작용에 의해서 free radical이 생성되며, 이것이 다시 보통의 산소(triplet oxygen, $^3O_2$)와 반응하여 peroxy radical이 생성되고 이것이 불포화지방산과 반응하여 hydroxyperoxide가 생성되게 된다. 한편 산소의 활성화 반응 즉, peroxy radical(O_2^-), hydroxy radical($^{\cdot}OH$), singlet oxygen($^1O_2$) 등의 활성산소는 동물이 생존하는 생태계에서 발생하며, 단백질과 지질 및 핵산 등과 쉽게 반응하게 되는데 이 활성산소가 체내 지질중 불포화지방산과 반응하여 과산화지질을 생성하게 된다[42]. 이외에도 생체내 free radical 생성은 mitochondria, microsome 등의 세포소기관과 xanthine oxidase, peroxidase 등 효소계의 정상대사 및 독성화

합물 등에 의한 손상시에도 생겨날 수 있으며[38] 이러한 생체내의 lipid peroxidation 과정을 억제하기 위해서는 지방식품의 산화방지에 사용되는 natural antioxidant로 Maillard reaction에서 생성되는 갈변색소성분, indole 및 polyphenol compound와 vitamin C, cobalamine(B_{12}), folic acid 및 vitamin E 등이 존재한다[42].

1980년 Patwardhan 등[28]은 사람에 caffeine투여시 혈액내 free fatty acid 함량이 증가하였다고 보고하였다. 또한 1967년 Peter 등[29]은 male, female rat에 매일 caffeine 185mg/kg을 투여하니 치사율에 대한 감수성은 년령이 증가할수록 높았다고 했으며, Naismith 등[26]은 rat에 동결건조된 커피를 54일 동안 급여한 결과 혈액내 cholesterol과 phospholipid 함량이 증가하였으나 triglyceride 함량은 오히려 감소하였으며, sucrose를 추가로 급여하니 triglyceride 함량은 오히려 증가한 반면에 cholesterol과 phospholipid 함량에는 변화가 없었다고 보고하였다. Bellet 등[4]은 개에 caffeine sodium benzoate를 정맥내로 투여한 후 blood clotting parameter와 혈액내 free fatty acid를 조사한 결과 투여 70-90분 사이에 free fatty acid가 증가하였고 투여 4시간째에 가장 증가하였으며, *in vitro* 실험에서 caffeine 투여 2시간 30분에서 4시간 사이에 heparin tolerance time과 plasma의 recalcification time 및 one-stage prothrombin time이 유의성있게 짧아졌다고 비교분석하는 등[10,32] 지금까지 caffeine에 대한 많은 연구가 행해지고 있다[2,8,9,20,25,30].

Caffeine에 대한 동물체내에서의 대사실험은 주로 caffeine을 단독 투여하여 혈액내 혈당과 지방성분을 조사한 것에 국한되어 있고, 배양세포주내에서 지질 및 단백질 성분의 과산화 정도와 지방산 조성을 비교해본 연구가 없고, caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시처리로 인한 상호작용을 조사한 바가 없기에, 본 실험에서는 배양세포주내에서의 *in vitro* 실험을 실시하여 caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시처리시 배양시간 경과별로 carbonyl group과 malondialdehyde의 농도변화와 지방산의 조성변화를 조사하여 배양세포주내에서 지질과 단백질 구성성분에 미치는 영향을 관찰해보고자 본 실험을 수행하게 되었다.

재료 및 방법

세포주 : 소 신장유래 세포주(Mardin-Darby Bovine Kidney cell line: MDBK)를 수의과학연구소에서 분양받아 실험에 사용하였다.

세포배양 : 수의과학연구소 바이러스과의 세포배양 방법에 따라 우태아혈청(5%), 50μg/ml gentamycin 및 2.2mg/ml sodium bicarbonate를 포함한 α-MEM (minimum essential medium)에 1×10^6/ml개의 농도로 부유시킨 MDBK 세포를 6 well microplate(Corning Co.)에 3ml씩 넣고 CO_2 incubator (5% CO_2)에서 24시간동안 배양하였으며, 단층배양된 세포를 phosphate buffer(1.37M NaCl, 0.015M KH_2PO_4, 0.027M Kcl, 0.081M Na_2HPO_4)로 두번 세척한 후 분석실험용 배양세포주로 이용하였다.

실험군 배치 및 약물처리 :

1) **실험군 배치** : 배양세포주 실험의 실험군 배치는 우선 MDBK cell에 약물처리를 하지 않은 대조군을 두고 (A군), 0.3mM caffeine 처리군(B군), 0.3mM ferric chloride와 0.3mM caffeine 혼합처리군(C군), 0.3mM caffeine과 0.3mM vitamin E 혼합처리군(D군)으로 나누어 CO_2 incubator에서 4, 8, 24, 48시간 배양후 각 시간별로 cell line을 채취한 후에 분석실험에 사용하였다.

2) **약물처리** : 실험군별로 caffeine과 ferric chloride는 0.3mM이 되도록 α-MEM에 혼합하였으며 vitamin E(0.3mM)는 microplate에 얇게 도포한 후 배양실험에 사용하였다.

Malondialdehyde 및 carbonyl group 함량측정 : Malondialdehyde 함량측정은 Ohkawa 등[27] 및 Slater 등[35]의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 일정량의 시료(mg protein에 해당하는 량)에 0.2ml의 8.1% sodium dodecyl sulfate 수용액과 1.5ml의 20% acetic acid(pH 3.5)와 1.5ml의 0.8% thiobarbituric acid 수용액을 첨가한 후 증류수로 총 부피를 4ml되게 만들어 95℃ shaking waterbath에서 60분간 가온한 뒤 즉시 얼음에 옮겨 식힌 다음 1ml의 증류수와 5ml의 n-butanol : pyridine(15 : 1, V / V)혼합액을 첨가하여 vortex mixer로 강하게 진탕한 후에 800g(Hettich Universal 2S)에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

Carbonyl group 함량측정은 Levine 등[19]의 방법에 의하여 측정하였다. 우선 일정량의 시료(mg protein에 해당하는 량)를 eppendorf tube에 취하여 50μl의 10% streptomycin sulfate를 가한 후에 5분간 얼음속에 놓아둔 뒤 100g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 분취하여 동일부피의 20% trichloroacetic acid(TCA)를 가하고 진탕(Vortex-Genie2)한 후 500g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다.

분리된 단백질에 0.5ml 10mM 2,4-dinitrophenylhydrazine(in 2N Hcl)을 첨가하여 37℃ shaking incubator에서 1시간동안 진탕배양한 후, 0.5ml 20% TCA를 첨가하고 500g에서 5분간 원심분리하여 침전된 반응단백질을 분리하였다. 이렇게 회수한 단백질을 0.6ml 6M guanidine hydrochloride (20mM potassium phosphate에 녹인 후 trifluoroacetic acid로 pH 2.3으로 만든 것)을 가하여 37℃ incubator에서 15분간 방치한 후 재용해시켜 10,000g(Hettich Mikro-Rapid)에서 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 368nm에서 흡광도를 측정하여 평균분자흡광계수 21.0 $M^{-1}cm^{-1}$를 곱하여 carbonyl group의 mole수를 산정하였다.

SDS-PAGE를 이용한 단백질 분석 : MDBK cell에서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용한 단백질변성 확인실험은 Laemmli [18]와 송 등[36]의 방법을 이용하였다. SDS buffer(glycerol 10ml, 2-mercaptoethanol 5ml, 20% SDS 11.5ml, 1.5M Tris-Hcl 42ml)에 시료를 동량 혼합한 다음 100℃에서 3분간 가열한 후 원심분리하여 SDS-polyacrylaminde gel(10% separating gel 및 4% stacking gel)을 이용하여 70V에서 15시간동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난후 gel을 0.1% Coomassie brilliant blue(50% methanol과 10% acetic acid의 혼합액에 용해한 수용액)로 2시간동안 단백질을 염색한 후 탈색용액(50% methanol과 10% acetic acid의 1 : 1 혼합액)으로 탈색시켜 각 시료의 구성단백질 상태를 비교 분석하였다.

배양세포주내에서의 지방산 분석 : MDBK cell 100μl를 screw cap tube에 분취한 후 Miller[21]의 방법에 따라 50% methanol에 용해한 1.2N NaOH를 1ml 가하여 Teflon-lined caps로 꼭 닫은 후 100℃ shaking water bath에 30분간 가열한 다음 30분후에 tube를 끄집어 내어 실온에서 서서히 냉각시킨다. 0.5ml 6M Hcl(pH2)을 가하고 1ml 10% boron trichloride(in methanol, Sigma 완제품)을 가하여 methylation을 촉매시켜 뚜껑을 완전히 닫은 후에 부드럽게 혼합하고 85℃ shaking waterbath에 5분간 방치한 다음, 실온에서 완전히 냉각시킨다. 그 다음에 fatty acid methyl ester를 추출하기 위하여 hexane/diethyl ether(1 : 1)를 가하고 3분동안 tube를 회전시키면서 부드럽게 혼합한 후에 상층의 용매층을 다른 tube에 분취한다. 마지막으로 3ml 0.3N NaOH를 용매층에 가한후 250g에서 5분간 원심분리후 상층액을 취하여 Table 1의 조건으로 Hewlett Packard gas chromatography Model 5890 Series II (HP 3396 series II Integrator)를 이용하여 지방산 조성을 분석하였다.

Table 1. The conditions of gas chromatography for analysis of fatty acid composition

Items	Conditions
Neumatics	
Carrier gas	Nitrogen
Column head pressure	25 psi
Split ratio	100:1
Septum purge	5ml/min
Column	HP-1 capillary column (Crosslinked Methyl Silicone Gum)
Column internal diameter	0.20mm
Film thickness	0.11μm
Length	25m
Phase ratio	450
Detector	FID(Flame Ionization Detector)
Oven temperature	
Initial temperature	145℃
Program rate	5℃/min
Final temperature	280℃
FID temperature	300℃
Injection port temperature	250℃
Integrator	
Threshold	-2
Attenuation	2↑0
Peak width	0.04
Retention time	25 min
Chart speed	1cm/min
Injection volumn	1μl

통계처리 : 모든 실험성적은 분산분석을 하여 F검정결과 유의성(5% 이상)이 나타난 것은 평균치를 구하여 완전 임의배치법에 따른 최소유의차(LSD)검정을 실시하였다[43].

결 과

배양세포주의 carbonyl group 함량변화 : 배양세포주(MDBK cells)에 caffeine 및 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E를 처리한 후 4, 8, 24, 48시간 경과시 carbonyl group의 함량변화를 비교해본 결과는 Table 2에서와 같이, caffeine 처리군(B군)에서는 배양 4시간 경과시

Table 2. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of carbonyl group in MDBK cells* according to the time lapsed (nmol/mg protein)

Experimental group	Time lapsed(hour)			
	4	8	24	48
A	$2.04^{a} \pm 0.08$	-	-	$2.23^{c} \pm 0.05$
B	$2.08^{a} \pm 0.10$	$2.13^{a} \pm 0.06$	$2.18^{c} \pm 0.03$	$2.24^{c} \pm 0.08$
C	$2.64^{b} \pm 0.07$	$2.83^{d} \pm 0.04$	$3.03^{f} \pm 0.10$	$3.24^{h} \pm 0.13$
D	$2.17^{c} \pm 0.04$	$2.38^{e} \pm 0.04$	$2.46^{e,g} \pm 0.04$	$2.58^{g} \pm 0.04$

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Means with different superscripts within groups and the time lapsed are different($p<0.01$)
The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests.
*: MDBK cells were grown in CO_2 incubator(5% CO_2).
A: Control group.
B: 0.3 mM caffeine was treated in the MDBK cells of α-MEM.
C: 0.3 mM caffeine and 0.3mM ferric chloride were treated in the MDBK cells of α-MEM.
D: 0.3 mM caffeine and 0.3mM vitamin E were treated in the MDBK cells of α-MEM.

Table 3. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of malondialdehyde in MDBK cells* according to the time lapsed (nmol/mg protein)

Experimental group	Time lapsed(hour)			
	4	8	24	48
A	$7.80^{a} \pm 0.72$	-	-	$8.06^{a} \pm 0.81$
B	$8.13^{a} \pm 0.70$	$8.43^{a} \pm 0.71$	$8.61^{a} \pm 0.36$	$9.13^{a} \pm 0.98$
C	$33.24^{b} \pm 1.58$	$40.24^{d} \pm 2.96$	$31.10^{b} \pm 1.53$	$25.24^{c} \pm 1.53$
D	$10.32^{c} \pm 0.16$	$10.46^{c} \pm 0.17$	$10.59^{c} \pm 0.50$	$10.43^{c} \pm 0.13$

^{a,b,c,d,e} Means with different superscripts within groups and the time lapsed are different($p<0.01$).
The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests.
*: MDBK cells were grown in CO_2 incubator(5% CO_2).
A: Control group.
B: 0.3 mM caffeine was treated in the MDBK cells of α-MEM.
C: 0.3 mM caffeine and 0.3mM ferric chloride were treated in the MDBK cells of α-MEM.
D: 0.3 mM caffeine and 0.3mM vitamin E were treated in the MDBK cells of α-MEM.

2.08nM/mg protein이였으나 48시간 경과시에는 2.24nM/mg protein을 보였으며($p<0.01$), caffeine과 철분 동시처리군(C군)에서는 대조군(2.04nM/mg protein)에 비하여 4시간 경과시에 2.64nM/mg protein으로 함량이 증가되었으며($p<0.01$) 점차 시간이 경과함에 따라 더욱 증가하여 48시간 경과시에는 대조군(2.23nM/mg protein)에 비해 3.24nM/mg protein까지 함량이 증가되었다($p<0.01$). 또한 caffeine과 vitamin E 동시처리군(D군)에서도 대조군(2.04nM/mg protein)에 비하여 4시간 경과시에 2.17nM/mg protein으로 유의성 있는 증가($p<0.01$)를 보였다가 점차 시간이 경과함에 따라 더욱 증가하여 48시간 경과시에는 대조군(2.23nM/mg protein)에 비해 2.58nM/mg protein까지 함량이 증가되었다($p<0.01$).

배양세포주의 malondialdehyde 함량변화 : 배양세포주에 caffeine 및 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E를 처리한 후 4, 8, 24, 48시간 경과시 malondialdehyde 함량변화를 조사한 결과는 Table 3에서와 같이, caffeine 처리군(B군)에서는 대조군과 유의성 있는 차이가 없었으나, caffeine과 철분 동시처리군(C군)에서는 대조군(7.80nM/mg protein)에 비하여 4시간 경과시에는 33.24nM/mg protein, 8시간 경과시에는 40.24nM/mg protein까지 증가되었고($p<0.01$), 48시간 경과시에는 25.24nM/mg protein의 함량을 보여 대조군(8.06nM/mg protein)에 비해 함량이 증가되었다($p<0.01$). 또한 caffeine과 vitamin E 동시

Table 4. Comparison of the effects of caffeine* on the major fatty acid compositions in MDBK cells** according to the time lapsed (%)

Time lapsed (hour)	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
control	$10.52^{b} \pm 0.34$	$3.10^{a} \pm 0.07$	$21.51^{A,B} \pm 0.20$	59.06 ± 1.33	$2.41^{a} \pm 0.03$	N.D	$3.40^{a} \pm 0.16$
4	$12.16^{a} \pm 0.17$	$2.74^{a,b} \pm 0.16$	$21.20^{A} \pm 0.30$	58.52 ± 0.96	$2.03^{b,c} \pm 0.07$	N.D	$3.35^{a} \pm 0.21$
8	$10.34^{b,c} \pm 0.24$	$2.07^{b} \pm 0.23$	$22.48^{C} \pm 0.49$	59.43 ± 0.74	$2.19^{a,b} \pm 0.13$	N.D	$3.49^{a,b} \pm 0.17$
24	$10.06^{b,c} \pm 0.17$	$2.22^{b} \pm 0.27$	$22.70^{C} \pm 0.38$	58.81 ± 0.88	$1.91^{b,c} \pm 0.14$	N.D	$4.30^{b,c} \pm 0.30$
48	$9.53^{c} \pm 0.16$	$2.03^{b} \pm 0.19$	$22.36^{B,C} \pm 0.20$	59.81 ± 0.66	$1.77^{c} \pm 0.20$	N.D	$4.51^{c} \pm 0.18$

^{A,B,C} Means with different superscripts within groups are different($p<0.05$).
^{a,b,c} Means with different superscripts within groups are different($p<0.01$).
The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests. N.D: Not detected.
*: 0.3 mM caffeine was treated in the MDBK cells of α-MEM.
**: MDBK cells were grown in CO_2 incubator(5% CO_2).

Table 5. Comparison of the effects of caffeine and iron* on the major fatty acid compositions in MDBK cells** according to the time lapsed (%)

Time lapsed (hour)	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
control	$10.52^{a} \pm 0.34$	$3.10^{A} \pm 0.07$	21.51 ± 0.20	59.06 ± 1.33	$2.41^{a} \pm 0.03$	N.D	$3.40^{a} \pm 0.16$
4	$10.76^{a} \pm 0.17$	$2.73^{B} \pm 0.30$	21.59 ± 0.91	58.24 ± 0.59	$2.03^{b} \pm 0.08$	N.D	$4.65^{b} \pm 0.30$
8	$10.75^{a} \pm 0.13$	$2.40^{B,C} \pm 0.25$	22.31 ± 0.51	57.50 ± 1.00	$1.82^{b} \pm 0.13$	N.D	$5.22^{d} \pm 0.17$
24	$9.71^{a,b} \pm 0.30$	$2.10^{C} \pm 0.33$	22.35 ± 0.41	59.13 ± 0.86	$1.71^{b} \pm 0.10$	N.D	$5.00^{c} \pm 0.25$
48	$9.02^{b} \pm 0.45$	$2.16^{C} \pm 0.21$	22.11 ± 0.58	59.81 ± 1.30	$1.78^{b} \pm 0.07$	N.D	$5.12^{d} \pm 0.20$

^{A,B,C} Means with different superscripts within groups are different($p<0.05$).
^{a,b,c,d} Means with different superscripts within groups are different($p<0.01$).
The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests. N.D: Not detected.
*: 0.3 mM caffeine and 0.3mM ferric chloride were treated in the MDBK cells of α-MEM.
**: MDBK cells were grown in CO_2 incubator(5% CO_2).

처리군(D군)에서도 대조군(7.8nM/mg protein)에 비하여 4시간 경과시에 10.32nM/mg protein으로 유의성 있는 증가를 보였으며($p<0.01$), 48시간 경과시에는 대조군(8.06nM/mg protein)에 비하여 10.43nM/mg protein까지 증가되었다($p<0.01$).

배양세포주내에서 지방산 조성의 변화 : 배양세포주(MDBK cells)에 caffeine을 처리한 후 4, 8, 24, 48시간 경과시 caffeine이 배양세포주의 지방산 조성에 미치는 변화를 gas chromatography로 관찰한 결과는 Table 4에서와 같이, palmitic acid(16 : 0)는 대조군(10.52%)에 비해 배양 4시간째에 12.16%로 조성비율이 증가되었다가 48시간 경과시에는 9.53%로 감소했으며($p<0.01$), palmitoleic acid(16 : 1)는 대조군(3.10%)에 비해 배양 8시간째 2.07%로 감소되었다($p<0.01$). 또한 stearic acid(18 : 0)의 조성비율은 대조군(21.51%)에 비하여 배양 8시간째 22.48%까지 증가되었으나($p<0.05$), linoleic acid(18:2)는 대조군(2.41%)에 비해 배양 4시간째 2.03%로 감소되었으며, 48시간 경과시에는 1.77%까지 배양시간이 길어짐에 따라 조성비율이 감소 되었다($p<0.01$). 반면에 arachidonic acid(20 : 4)는 대조군(3.4%)에 비해 배양 24시간(4.30%) 부터 비율이 증가되었다($p<0.01$).

Caffeine과 철분을 동시에 배양세포주에 처리시 지방산 조성에 미치는 영향을 본 결과(Table 5), palmitic acid는 대조군(10.52%)에 비해 배양 48시간 경과시 조성비율(9.02%)이 감소했으며($p<0.01$), palmitoleic acid(16 : 1)도

Table 6. Comparison of the effects of caffeine and vitamin E* on the major fatty acid compositions in MDBK cells** according to the time lapsed (%)

Time lapsed (hour)	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
control	$10.52^{A,B} \pm 0.34$	$3.10^{a} \pm 0.07$	$21.51^{A} \pm 0.20$	59.05 ± 1.32	$2.41^{a} \pm 0.03$	N.D	$3.41^{a} \pm 0.16$
4	$11.27^{A} \pm 0.33$	$2.50^{b} \pm 0.04$	$21.02^{A} \pm 0.45$	58.91 ± 0.59	$1.70^{b} \pm 0.11$	N.D	$4.60^{b} \pm 0.14$
8	$10.92^{A} \pm 0.27$	$2.41^{b,c} \pm 0.16$	$23.02^{C} \pm 0.35$	57.34 ± 1.20	$1.78^{b} \pm 0.07$	N.D	$4.53^{b} \pm 0.17$
24	$10.14^{B,C} \pm 0.28$	$2.24^{c} \pm 0.10$	$22.33^{B} \pm 0.20$	59.41 ± 0.72	$1.75^{b} \pm 0.08$	N.D	4.13b ± 0.12
48	$9.70^{C} \pm 0.25$	$2.36^{c} \pm 0.13$	$22.91^{B,C} \pm 0.58$	59.41 ± 0.99	$1.42^{b} \pm 0.12$	N.D	$4.20^{b} \pm 0.08$

^{A,B,C} Means with different superscripts within groups are different($p<0.05$).
^{a,b,c} Means with different superscripts within groups are different($p<0.01$).
The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests. N.D: Not detected.
*: 0.3 mM caffeine and 0.3mM vitamin E were treated in the MDBK cells of α-MEM.
**: MDBK cells were grown in CO_2 incubator(5% CO_2).

대조군(3.10%)에 비해 배양 4시간 경과시 2.73%로 감소되었으며 48시간 경과시에는 2.16%까지 감소되었다($p<0.05$). Linoleic acid는 대조군(2.41%)에 배양 4시간째 2.03%로 감소했으며 48시간 경과시에는 1.78%까지 감소되었다($p<0.01$). 반면에 arachidonic acid(20 : 4)의 조성비율은 대조군(3.40%)에 비해 배양 4시간째 4.65%로 증가되었으며 24시간 경과시에는 5.00%, 48시간 경과시에는 5.12%까지 유의성 있게 증가되었다($p<0.01$).

Caffeine과 vitamin E를 동시에 처리한 배양세포주내의 지방산 조성을 보면(Table 6), palmitic acid(16 : 0)는 대조군(10.52%)에 비하여 배양 24시간과 48시간 경과시에 10.14, 9.70%로 감소되었으며($p<0.05$), palmitoleic acid(16 : 1)는 대조군(3.10%)에 비해 배양 4시간째 조성비율이 2.50%까지 감소되었다($p<0.01$). 포화지방산인 stearic acid(18 : 0)는 반대로 대조군(21.51%)에 비해 배양 8시간째 조성비율이 23.02%까지 증가되었다($p<0.05$). 또한 linoleic acid(18 : 2)는 대조군(2.41%)에 비해 배양 4시간 경과시 조성비율이 1.70%까지 감소($p<0.01$)한 반면, arachidonic acid(20 : 4)는 대조군(3.41%)에 비해 배양 4시간째 비율이 4.60%까지 증가되어($p<0.01$) 48시간까지 지속되었다.

Caffeine, ferric chloride 및 vitamin E를 처리하고 반응시간을 달리한 배 양세포주(MDBK cells)의 단백질 분석 : 0.3mM caffeine 단독 및 0.3mM caffeine과 0.3mM $FeCl_3$ 또는 0.3mM vitamin E를 동시에 MDBK 세포주에 처리한 후 각각 4, 8, 24, 48시간 경과시 배양세포주내의 구성단백질을 전기영동으로 비교해본 결과는 Fig 1에서와 같이, caffeine과 $FeCl_3$를 동시에 처리한 군에서 배양 4시간부터 43kd(kilo-dalton)와 200kd 부근에서 단백질 전기영동 형태의 큰 변화를 나타내었으며, 배양 48시간째에는 더욱 더 심한 변화가 나타났다. 또한 caffeine과 vitamin E 동시투여군에서도 43kd와 200kd 사이의 분자량 분획

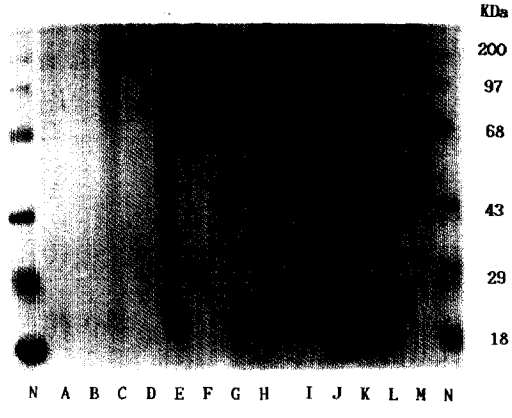

Fig 1. Comparison of the protein profiles in MDBK cells*.*: 0.3 mM caffeine, 0.3mM ferric chloride and 0.3mM vitamin E were treated in the MDBK cells of α-MEM and were grown in CO_2 incubator(5% CO_2).A: Control, B: 4hr lapsed-caffeine (0.3mM), C: 4hr lapsed-caffeine(0.3mM) & $FeCl_3$(0.3mM), D: 4hr lapsed-caffeine(0.3mM) & vitamin E(0.3mM), E: 8hr lapsed-caffeine(0.3mM) & $FeCl_3$(0.3mM), F: 8hr lapsed-caffeine(0.3mM) & vitamin E(0.3mM), G: 24hr lapsed-caffeine(0.3mM), H: 24hr lapsed-caffeine(0.3mM) & $FeCl_3$(0.3mM), I: 24hr lapsed-caffeine(0.3mM) & vitamin E(0.3mM), J: Control, K: 48hr lapsed-caffeine(0.3mM), L: 48hr lapsed-caffeine(0.3mM) & $FeCl_3$(0.3mM), M: 48hr lapsed-caffeine(0.3mM) & vitamin E(0.3mM), N: Standard molecular weight mark.

에서도 배양 4시간 부터 단백질의 전기영동형태에 변화가 일어나 배양 48시간까지 지속되었다. 그러나 caffeine 단독처리군에서는 차이점을 발견할 수 없었다.

고 찰

배양세포주인 MDBK cell에 caffeine 및 caffeine과 철분, caffeine과 vitamin E처리시 지질 및 단백질의 과산화물인 malondialdehyde와 carbonyl group의 함량을 분석하고, SDS-PAGE를 이용하여 배양세포주의 단백질 구조상의 변화를 관찰함과 아울러 MDBK cell내 지방산 조성을 비교분석함으로써 caffeine, 철분 및 vitamin E가 배양세포주의 지질 및 단백질 구성성분에 미치는 영향을 확인하기 위하여 본 실험을 수행하게 되었다.

배양세포주인 MDBK cell에 caffeine 및 caffeine과 철분 또는 vitamin E를 처리한 후 4, 8, 24, 48시간 경과시 carbonyl group 함량을 조사해본 결과(Table 2), caffeine 처리군에서 배양시간이 길어질수록 MDBK cell내 carbonyl group 함량이 약하게 증가되었으며, caffeine과 vitamin E 혼합처리군에서도 배양시간이 길어짐에 따라 carbonyl group 함량이 증가되었다($p<0.01$). 이는 MDBK cell에 caffeine과 vitamin E를 처리한 후 5% CO_2 incubator에서 48시간동안 배양시 O_2에 의한 autooxidation의 결과와 vitamin E가 O_2에 의해 inactive type인 tocopherylquinone으로 전환되어 지질성분의 과산화작용이 촉진된[6,15,42] 결과 때문으로 생각되며, caffeine과 철분 처리군에서 대조군에 비해 carbonyl group의 유의성 있는 증가($p<0.01$)는 배양시간이 경과함에 따라 더욱 상승하였는데, 이는 강력한 oxidant인 철분이 MDBK cell을 oxidation시켜 peroxide를 생성함으로써 지질 및 단백질 구성성분에 산화적 손상을[37,39] 초래하였기 때문으로 사료된다. 이는 지질과산화물인 malondialdehyde 함량이(Table 3) carbonyl group과 유사한 결과를 나타낸 것으로 보아 O_2에 의한 autooxidation[42]과 철분에 의한 peroxidation[11]의 결과라는 것을 뒷받침해주고 있음을 알 수 있다.

배양세포주인 MDBK cell에 caffeine 및 caffeine과 철분 또는 vitamin E를 동시에 처리시 MDBK cell을 구성하고 있는 지방산 조성에 미치는 영향을 조사해본 결과, caffeine 단독처리군(Table 4)에서 palmitic acid는 48시간 경과시에 조성비율이 감소되었고, palmitoleic acid와 linoleic acid는 4시간 경과시 부터 감소되었으며($p<0.01$), stearic acid는 배양 8시간째 함량이 증가되었고($p<0.05$), arachidonic acid도 배양 24시간째부터 비율이 증가되었다($p<0.01$). Caffeine과 철분 동시처리군(Table 5)에서 palmitic acid는 배양 48시간째 조성비율이 유의성 있게 감소되었으며($p<0.01$), palmitoleic acid는 배양 4시간째부터 감소되었고($p<0.05$), linoleic acid도 4시간 경과시부터 감소하여($p<0.01$) 48시간까지 지속되었으며 arachidonic acid는 배양 4시간째부터 비율이 증가되었다($p<0.01$). Caffeine과 vitamin E 처리군(Table 6)에서 palmitic acid는 배양 48시간째 감소되었으며($p<0.05$), palmitoleic acid와 linoleic acid는 배양 4시간 경과시부터 감소되었다($p<0.01$). Stearic acid는 8시간째 증가되었으며($p<0.05$), arachidonic acid는 4시간 경과시부터 비율이 증가하여($p<0.01$) 48시간까지 지속되었다. 이와같은 결과는 배양세포주에 세포배양기내의 O_2가 autooxidation을 야기하고 여기에서 생성된 free radical이 지질성분에 peroxidation 반응을 일으킴으로써[11,17,24] palmitoleic acid의 비율이 감소하고 stearic acid의 비율이 증가한 것으로 생각되며, linoleic acid의 비율이 감소하고 arachidonic acid의 비율이 증가한 것은 ω^6 series가 chain elongation과 desaturase system에 의해 촉매되어 linoleic acid가 arachidonic acid로 전환이[23] 증가되었기 때문이라 사료된다.

배양세포주(MDBK cell)에서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 단백질 손상여부를 관찰한 결과(Fig 1), caffeine과 철분 또는 vitamin E 혼합처리군에서 배양시간이 경과함에 따라 분자량 43kd에서 200kd사이에서 현저한 단백질의 산화적 손상을 관찰할 수 있었다. 이는 배양세포주에 caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시처리시 배양기내의 O_2에 의해 vitamin E가 불활성화되고 철분에 의해 MDBK cell 성분에 peroxidation을 일으켜 산생된 free radical에 의해 구성단백질에 산화적 손상을[37,39] 가져왔기 때문으로 사료된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 caffeine은 배양세포주내에서 malondialdehyde와 carbonyl group 함량에는 영향을 미치지 않았으나 철분은 carbonyl group과 malondialdehyde 함량을 증가시켰으며, 철분과 vitamin E는 caffeine의 작용에 직접적인 영향은 미치지 않고 다만 철분이 지질성분에 부가적으로 하나의 oxidant로 작용하고 있음을 관찰할 수 있었다. 본 실험을 통하여 지금까지 연구가 미흡한 배양세포주내의 지방산 조성을 관찰한 결과, caffeine은 동물체내에서 뿐만 아니라 배양세포주의 지방산 성분에도 영향을 미치고 있음을 알 수 있었으며, SDS-

PAGE를 통해 단백질 구성성분의 손상을 조사한 결과 동물체내 단백질 구성성분에는 caffeine이 직접적인 영향을 미치지 않고 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

Caffeine 및 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E를 배양세포주내에 처리시 지질과 단백질 구성성분에 미치는 영향을 살펴보기 위하여MDBK(Mardin-Darby Bovine Kidney) cell에 약물을 처리하지 않은 대조군(A군), caffeine(0.3mM) 처리군(B군), caffeine(0.3mM)과 철분(0.3mM) 처리군(C군), caffeine(0.3mM)과 vitamin E(0.3mM) 처리군(D군)으로 나누어 5% CO_2 배양기에서 4, 8, 24, 48시간 배양후 각 시간별로 세포주를 채취하여 실험하였다. 배양세포주내 carbonyl group과 malondialdehyde 함량 그리고 MDBK cell을 구성하고 있는 구성단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 관찰하여 단백질의 산화적 손상여부와 지질 과산화물에 미치는 영향을 조사하였으며, 배양세포주를 구성하고 있는 지방산 조성을 분석하였다.

1. 배양세포주인 MDBK cell에 caffeine 및 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E를 처리한 후 4, 8, 24, 48시간 경과시 carbonyl group과 malondialdehyde 함량을 조사해 본 결과, C군과 D군에서 A군에 비해 carbonyl group과 malondialdehyde 함량의 유의성 있는 증가를 볼 수 있었다($p<0.01$).

2. MDBK cell을 구성하고 있는 지방산에 대한 영향을 조사해본 결과 caffeine 단독 처리군과 caffeine과 vitamin E 처리군 및 caffeine과 철분 혼합처리군에서 불포화지방산인 palmitoleic acid와 linoleic acid의 조성비율이 감소하고 arachidonic acid의 조성비율이 배양시간이 길어짐에 따라 상승하였다($p<0.01$).

3. SDS-PAGE를 통해 배양세포주를 구성하고 있는 단백질의 산화적 손상여부를 확인해 본 결과 caffeine과 철분, caffeine과 vitamin E 혼합처리군에서 배양시간이 길어짐에 따라 분자량 43kd에서 200kd 사이에서 현저한 단백질의 손상을 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Acheson KJ, Markiewicz BZ, Anantharaman K, *et al.* Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *Am J Clin Nutr*, 33:989-997, 1980.
2. Akinyanju P, Yudkin J. Effect of coffee and tea on serum lipids in the rat. *Nature*, 214:426-427, 1967.
3. Alexander F. An introduction to veterinary pharmacology. 3rd ed. London, Churchill livingstone, 144-147, 1976.
4. Bellet S, Feinberg LJ, Sandberg H, *et al.* The effect of caffeine on free fatty acids and blood coagulation parameters of dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 159:250-254, 1968.
5. Boyd EM. The acute oral toxicity in guinea pigs of acetylsalicylic acid, phenacetin, and caffeine, alone and combined. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2:23-32, 1960.
6. Carpenter MP. The lipid composition of maturing rat testis. *Biochem Biophys Acta*, 231:52-79, 1971.
7. Clark WG, Craig brater D, Johnson AR. Goth's medical pharmacology. St. Louis, The C V Mosby Company, 302-307, 1988.
8. Clozel M, Branchaud CL, Tannenbaum GS, *et al.* Effect of caffeine on thyroid and pituitary function in newborn rats. *Pediatr Res*, 17:592-595, 1983.
9. DeCastro O, Sandberg H, Feinberg LJ, *et al.* Effects of various routes of caffeine administration on oral and intravenous glucose tolerance tests in dogs. *Metabolism*, 18:163-171, 1969.
10. Gilbert NC, Dey F, Trump R. The effect of the methylated xanthines on the clotting time of the blood. *J Lab Clin Med*, 32:28-33, 1947.
11. Golberg L, Martin LE, Batchelor A. Biochemical changes in the tissues of animals injected with iron. *Biochem J*, 82:291-297, 1962.
12. Hartley R, Smith LJ, Cookman JR. Improved HPLC method for the simultaneous determination of caffeine and its N-demethylated metabolites in plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogram*, 342:105-117, 1985.
13. Heaney RP, Recker RR. Dietary caffeine and calcium excretion. *Nutritional Review*, 46:232-234, 1988.
14. Hooser SB, Beasley VR. Current veterinary therapy -

methylxanthine poisoning(chocolate and caffeine toxicosis). Philadelphia, WB Saunders Co, 191-192, 1986.
15. Jacob HS, Lux SE. Degradation of membrane phospholipids and thiols in peroxide hemolysis-studies in vitamin E deficiency. *Blood*, 32:549-568, 1968.
16. James EF. The extra pharmacopoeia. 29th ed. London, The pharmaceutical press, 1521-1524, 1989.
17. Kaneko JJ. Clinical biochemistry of domestic animals, New York, *Academic Press*, 256-273, 1989.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 27: 680-685, 1970.
19. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol*, 186:464-478, 1990.
20. Lillemoe KD, Magnuson TH, High RC, *et al.* Caffeine prevents cholesterol gallstone formation. *Surgery*, 106: 400-407, 1989.
21. Lindy Miller. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids as a bacterial identification aid. *Hewlett Packard Application Note*, 228:1-7, 1984.
22. Lopes JM, Aubier M, Jardim J, *et al.* Effect of caffeine on skeletal muscle function before and after fatigue. *J Appl Physiol*, 54:1303-1305, 1983.
23. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 232-236, 1983.
24. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 249-256, 1983.
25. Mitchell MC, Hoyumpa AM, Schenker S, *et al.* Inhibition of caffeine elimination by short-term ethanol administration. *J Lab Clin Med*, 101:826-834, 1983.
26. Naismith DJ, Akinyanju PA, Yudkin J. Influence of caffeine-containing beverages on the growth, food utilization and plasma lipids of the rat. *J Nutr*, 97:375-381, 1969.
27. Okawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358, 1978.
28. Patwardhan RV, Desmond PV, Johason RF, *et al.* Effect of caffeine on plasma free fatty acids, urinary catecholamines, and drug binding. *Clin Pharmacol Ther*, 28:398-403, 1980.
29. Peter JM, Boyd EM. The influence of sex and age in albino rats given a daily oral dose of caffeine at a high dose level. *Canad J Physiol pharmacol*, 45:305-311, 1967.
30. Renner E, Wietholtz H, Huguenin P, *et al.* Caffeine: A model compound for measuring liver function. *Hepatology*, 4:38-46, 1984.
31. Ruby DR, Lee S. Coffee and hypokalemia. *J Famil Prac*, 26:679-680, 1988.
32. Scherf D, Schlachman M. The effect of methyl xanthines on the prothrombin time and the coagulation of the blood. *Amer J Med Sci*, 212:83-89, 1946.
33. Schlosberg AJ. Acute and chronic effects of caffeine on brain monoamine levels and endocrine function in the rat. *Arch Int Pharmacodyn*, 267:149-160, 1984.
34. Scott NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of the urinary metabolites of caffeine and theophilline by HPLC. *J Chromatogram*, 375:321-329, 1986.
35. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fraction *in vitro*. *Biochem J*, 123:805-814, 1971.
36. Song CS, Lee TC. Effect of chemical inactivants on viral polypeptide of newcastle disease virus. *Res Rept RDA*(V), 30:77-89, 1988.
37. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J B C*, 266:2005-2008, 1991.
38. Tappel AL. Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. New York, *Ana NY Acad Press*, 355:18-31, 1980.
39. Tappel AT. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc*, 32:1870-1874, 1973.
40. Whiting SJ, Whitney HL. Effect of dietary caffeine and theophilline on urinary calcium in the rat. *J Nutr*, 117:1224-1228, 1987.
41. Yeh JK, Aloia JF, Semla HM, *et al.* Influence of injected caffeine on the metabolism of calcium and the retention and excretion of sodium, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and copper in rats. *J Nutr*, 116:273-280, 1986.

42. 김세권. 생화학. 서울, 청문각, 149-172, 1993.
43. 조재영, 장권열. 실험통계분석법. 10판. 서울, 향문사, 104-106, 1986.