

## 흰쥐의 肝 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 Ethionine의 影響

尹鍾國 · 申重圭\* · 李相日\*\*

啓明大學校 自然科學大學 公衆保健學科

\* 大邱韓醫科大學 保健經濟學科

\*\* 啓明實業專門大學 食品營養學科

### An Effect of Ethionine Treatment on the Activity of Hepatic Xanthine Oxidase in Rats

Jeog Gook Yoon · Joong Ku Sin\* · Sang Il Lee\*\*

*College of Natural art Science, KyeMyung University*

\* *Dept. of Public health economy, School of TaeGu Korean medicine*

\*\* *Kye Myung Junior College*

#### ABSTRACT

Liver and serum xanthine oxidase(XOD) activity were determined in rats treated with DL-ethionine. Concomitantly, the enzyme activity was compared with that of rats treated with CCl<sub>4</sub>, actinomycin D and those fed a protein depleted diet.

The activity of XOD in liver was inhibited by injection of ethionine to the rats. But, there were no differences in activity of serum XOD between control group and ethionine-treated rats. And the pattern of changes in enzyme activity of serum and liver in ethionine-treated rats, was similar with actinomycin D treated rats or those fed a protein depleted diet. On the other hand, the activity of XOD was rather elevated both in serum and liver by injection of CCl<sub>4</sub> to rats.

#### I. 緒 論

Xanthine Oxidase(以下 XOD라 略함)는 生體內에서 purine體 代謝의 最終단계에 關與하는 非特異的인 酵素로서<sup>1)</sup> virus<sup>2,3)</sup>, 細菌<sup>4)</sup> 및 protozoa<sup>5)</sup> 등의 感染에 依한 肝損傷 뿐만 아니라 exotoxin과 같은 生物學的 毒物<sup>4)</sup> 및 有害公害性 xenobiotics의 一種인 四鹽化炭素(以下 CCl<sub>4</sub>라 略함)의 投與에 依한 肝損傷時에도 肝 및 血清中 그 活性이 增加되는 것으로 알려져 있고<sup>6,7)</sup> 臨床的으로도 그 重要性이 인식되고 있는 것이다.

최근尹<sup>7)</sup>은 CCl<sub>4</sub> 투여에 依한 肝損傷時 肝 및 血

清 中の 本酵素의 活性 增加 現像은 肝損傷에 따른 核酸性 物質의 分解代謝가 촉진되어, 이에 수반된 基質性 誘導作用으로 本 酵素蛋白의 合成이 增加되기 때문이라고 하였다.

한편 實驗動物을 食餌性蛋白質의 含量을 低下시켜 成長시켰을 때<sup>8,9)</sup>와 蛋白合成阻害劑인 actinomycin D 投與時<sup>7,10)</sup>에는 本 酵素의 活性이 현저히 減少된다고 한바, 蛋白合成을 阻害하는 것으로 알려져 있는 CCl<sub>4</sub><sup>11)</sup>와는 相反된 反應을 나타내는 것으로, 이는 xenobiotics의 種類別에 따라 代謝에 關여하는 蛋白의 選擇的인 합성유도가 이루어진다는 것을 암시하고 있다.

Smuckler等<sup>12)</sup>은 實驗動物에 CCl<sub>4</sub>를 急性的으로

投與하였을 때, RNA의 합성에 영향을 미치지 않으나, methionine의拮抗劑인 ethionine 投與時에는 RNA의 합성에變化가 야기된다고 하였다. 따라서 ethionine 역시 酵素別 蛋白質의 合成過程에 선택적인 영향을 나타낼 것으로 사료된다.

그러므로 ethionine 投與에 의한 本 酵素의 活性變動을 觀察하는 것은 生體內에서 여러가지 xenobiotics들에 對한 病態生化學的 기초자료를 제시할 수 있을 것으로 기대되며, 또한 XOD 活性變動에 대한 機轉糾明의 일환으로서 의의가 있다고 사료된다. 이에 本 研究에서는 實驗動物에 DL-ethionine을 投與한 다음 肝과 血清中 XOD의 活性變動을 CCl<sub>4</sub>, actinomycin D 및 低蛋白食餌로 成長시킨 實驗動物에서와 相互 比較 檢討코 하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗動物

實驗動物은 標準食餌(Table 1)로 約 2個月間 飼育시킨 270~300g의 Sprague-Dawley種 숫쥐를 사용하였다. 한편 低蛋白食餌條件은 蛋白含量을 低下시킨 食餌로 역시 2個月間 飼育시킨 190~210g되는 S-D系 숫쥐를 사용하였다(Table 1 參照).

Ethionine 投與는 DL-ethionine을 saline에 溶解시켜 體重 100當 25mg를 12時間 간격으로 2回 腹

腔內 注射하였으며<sup>13)</sup>, CCl<sub>4</sub>는 olive oil에 50% 溶解시킨 것을 體重 100當 0.15ml를 1日 1回 3번 皮下에 投與하였다. 이 때 對照群은 olive oil만 投與하였다. Actinomycin D投與는 他群의 실험기간에 병행하여 體重 100當 50 $\mu$ g<sup>7)</sup>을 大腿 外側 筋肉에 注射하였다. 動物의 처치는 ethionine 경우에는 注射한 다음 12時間後, CCl<sub>4</sub> 및 actinomycin D는 24時間後, 輕度の ether 癡醉下에 腹部大動脈으로부터 採血하고 肝臟은 0.25M sucrose로 貫流하여 肝組織內 남아있는 血液을 除去한 다음 摘出하였다.

### 2. 組織液의 酵素液 調劑

組織은 4℃下에서 절편으로 만들고 그 中 一定量을 秤量하여 4倍量의 氷冷의 0.25M sucrose液을 添加시켜 teflon glass homogenizer로 磨碎하여 肝均質液(20W/V)을 만들었다. 이 均質液을 4℃下에서 700×g 速度로 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎分을 除去한 다음 그 上層液을 15,000×g에서 20分間 遠心分離하여 上層液을 얻었다. 이 上層液 一部를 細胞性 蛋白質 測定에 使用하였다. 다른 一定量을 取하여 透析膜에 넣어 50倍量의 4℃ 0.25M sucrose 液中에서 透析시킨 것을 XOD 효소 활성측정에 사용하였다.

### 3. 肝 및 血清中 XOD 酵素活性의 測定

XOD 測定은 尹의 方法<sup>14)</sup> 및 Della Corte方法<sup>15)</sup>

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet).

Ingredients	Standard protein diet	Low protein diet
Casein	200	70
Corn starch	674.36	804.36
Corn oil	54.8	54.8
Vitamin A & D mixture (a)	10.2	10.2
Vitamine E & K mixture (b)	2	2
Water soluble vitamine mixture (c)	3	3
Vitamine B <sub>12</sub> (d)	1	1
Salt mixture (e)	40	40
$\alpha$ -Cellulose	20	20

a) ; 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100 ml of corn oil.

b) ; 5g of  $\alpha$ -tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200ml of corn oil.

C): contained (mg) : choline chloride 2000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, P-aminobenzoic acid 100.

d) ; 5mg of vitamine B<sub>12</sub> dissolved in 500ml of distilled water.

e) ; contained (g) : CaCO<sub>3</sub> 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSO<sub>4</sub> 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl<sub>2</sub> 0.25, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.3, MnSO<sub>4</sub> 5, molybdic acid 0.2.

에 따라 實施하였으며 酵素單位는 肝組織에서는 基質로부터 1分 동안에 生成된 尿酸의 量을 酵素液中含有된 蛋白質 1mg當 n mole, 血清中에서는 血清 m/當 n mole로 表示하였다.

#### 4. 試驗管內에서 ethionine 첨가로 인한 肝 XOD 活性測定

試驗管內에서 尹의 方法<sup>14)</sup>에 따른 XOD 反應液에 肝조직 20mg에 해당되는 효소에 DL-ethionine 25, 50 μg을 함유시킨 후 37°C에서 一定 時間동안 反應시킨 후 酵素活性를 測定하였다.

#### 5. 血清中的 alanine aminotransferase (以下 ALT라 略함) 活性測定

肝 및 血清의 ALT活性測定은 Reitman과 Frankel의 方法<sup>16)</sup>에 의해 測定하였으며 酵素單位는 肝組織에서는 1mg當, 血清에서는 血清 1m/當 Karmen<sup>17)</sup> unit로 表示하였다. 蛋白質의 定量은 Lowry等의 方法<sup>18)</sup>에 따라 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 使用하였다.

### III. 實驗成績

#### 1. 體重當 肝 무게 變動

Table 2. Liver weight per body weight in rats treated with CCl<sub>4</sub>, PL-ethionine and actinomycin D, and in those fed protein depleted diet.

Groups	Control	CCl <sub>4</sub> -treated	Actinomycin D	Ethionine	Low protein diet
Liver wt % Body wt	2.83 ± 0.07(6)	3.93 ± 0.22(6)***	2.40 ± 0.20(7)**	3.37 ± 0.110(6)**	3.05 ± 0.15(5)

Values are the mean±S.E. of the number of rats given in parentheses  
\*\* ; P < 0.01 from the control group, \*\*\* ; p < 0.001 from the control group.

Table 3. The serum levels of ALT and hepatic protein contents in rats treated with CCl<sub>4</sub>, DL-ethionine and actinomycin D, and in those fed protein depleted diet

Groups	Control (6)	CCl <sub>4</sub> -treated(6)	Actinomycin D(7)	Ethionine (6)	Low protein (5)
ALT (Karmen unit)	33 ± 1.20	180 ± 8.20***	94 ± 4.0***	60 ± 5.46**	33.5 ± 2.95
Protein (mg/g. wet. liver)	120 ± 4.94	98.6 ± 5.00*	119.4 ± 2.57	117.15 ± 5.42	124 ± 3.40

Values are the mean±S.E. of the number of rats given in parentheses  
\* ; p < 0.05 from the control group, \*\* ; p < 0.01 from the control group.  
\*\*\* ; p < 0.001 from the control group.

Ethionine 投與群과 CCl<sub>4</sub> 投與群은 對照群에 比하여 各各 約 20% (p < 0.01), 39% (p < 0.001)의 有意한 增加를 나타내어 CCl<sub>4</sub> 投與群이 ethionine 投與群 보다 肝 무게 增加率이 높게 나타남을 알 수 있었다. 한편 actinomycin D 投與群은 對照群에 比하여 約 15% 減少되는 傾向을 보였으며, 低蛋白質食餌로 成長한 實驗群과 標準蛋白質食餌群間에는 別다른 差異를 볼 수 없었다 (Table 2 參照).

#### 2. 血清 ALT 活性 및 肝組織 含量變動

血清中 ALT 活性에 있어서 ethionine 投與群과 actinomycin D 投與群은 對照群에 比하여 各各 2倍 (p < 0.01), 2.8倍 (p < 0.001)의 有意한 增加를 보였다. CCl<sub>4</sub>를 投與한 實驗群은 對照群에 比하여 約 5.4倍의 현저한 增加를 보였다. 低蛋白質食餌群과 對照群間에는 別다른 差異를 볼 수 없었다. 肝細胞中 蛋白質含量은 CCl<sub>4</sub> 投與時에 對照群에 比하여 有意한 (p < 0.05) 減少를 보였으나 ethionine 投與群, actinomycin D 投與群 및 低蛋白質食餌群 모두 대조군 간에 別다른 差異를 볼 수 없었다 (Table 3 參照).

#### 3. 血清 및 肝組織 中 XOD 活性變動

肝組織中 XOD 活性를 蛋白質 mg當 unit로 表示할

Table 4. Xanthine oxidase activity in rats treated with CCl<sub>4</sub>, PL-ethionine and actinomycin D, and in those fed protein depleted diet.

Groups	Control (6)	CCl <sub>4</sub> (6)	Actinomycin D(7)	Ethionine (6)	Low protein(5)
Unit /mg of protein	3.30 ± 0.26	3.40 ± 0.20	1.96 ± 0.12***	2.87 ± 0.14	0.48 ± 0.04***
unit × 10/100 g. body wt	150.0 ± 4.81	170.2 ± 11.17*	77.3 ± 6.21***	130.9 ± 14.19	25.87 ± 4.24***
unit /ml of serum	24 ± 3.0	47 ± 7.2*	27 ± 2.5	23.8 ± 2.12	27.0 ± 4.30

Unit; n mole uric acid formed/min.

Values are the mean±S.E. of the number of rats given in parentheses.

\* ; p<0.05 from the control group,

\*\*\* ; p<0.01 from the control group.

경우에 있어서 ethionine 投與群은 對照群에 比하여 約 13% 減少되는 傾向을 보였으며, actinomycin D 投與群은 對照群에 比하여 約 41%의 有意한(p<0.001) 減少를 나타내었다. 低蛋白食餌群도 역시 85%의 현저한 減少를 보였다. 그리고 CCl<sub>4</sub> 投與群은 對照群 間에 別다른 差異를 볼 수 없었다. XOD 活性을 體重 100g當 肝組織中 unit로 表示할 경우에 있어서도 ethionine 投與群은 對照群에 比하여 約 13% 감소되는 경향을 보였으며 actinomycin D 投與群은 對照群에 比하여 約 48%(p<0.001)의 유 의한 감소를 나타내었다. 低蛋白食餌群도 對照群에 比하여 約 83%의 현저한 감소를 보였다. 한편 血清中 XOD 活性에 있어서는 CCl<sub>4</sub>를 投與한 群은 對照群에 比하여 約 2배의 有意한(p<0.05) 增加를 보였으나 actinomycin D 投與群, ethionine 및 低蛋白食餌群은 各各 對照群 間에 別다른 差異를 볼 수 없었다(Table 4 參照).

#### 4. 試驗管內에서 ethionine이 肝 XOD 活 性에 미치는 영향

試驗管內에 肝組織 20mg에 해당되는 효소에 DL-ethionine 25, 50 μg을 함유시킨후 실험방법에서 기술한 XOD 측정과 같은 반응액을 만든 후 37℃에 작용했을 때 ethionine을 첨가하지 않은 조건에 比하여 酵素活性은 別다른 變動을 볼 수 없었다(Fig. 1 參照).

### IV. 考 察

本 實驗에서 實驗動物에 ethionine을 投與하였을

때 體重當 肝 무게, 血清 ALT 活性 및 肝組織中 蛋白質含量이 CCl<sub>4</sub> 投與群에서 보다 경미하지만 對照群에 比하여 有意한 變動을 나타내고 있어 肝損傷이 惹起된 것을 알 수 있었다.

이러한 조건下에서 肝 XOD 活性을 測定하였을 때, ethionine 投與群에서 對照群에 比하여 減少되는 傾向을 보였으며, 血清中 本酵素의 活性은 對照群과 別다른 差異를 볼 수가 없었다. 이 결과는 hepatotoxin인 CCl<sub>4</sub>를 投與한 群과는 相異한 것으로, 程度의 차이는 있으나 actinomycin D 投與群 및 低蛋白食餌로 成長시킨 實驗動物의 肝 XOD 活性和 類似한 양상을 보였다.

Ethionine을 實驗動物에 急性的으로 投與하였을 때는 肝組織에 脂肪變性<sup>19,20</sup>을, CCl<sub>4</sub>를 投與하는

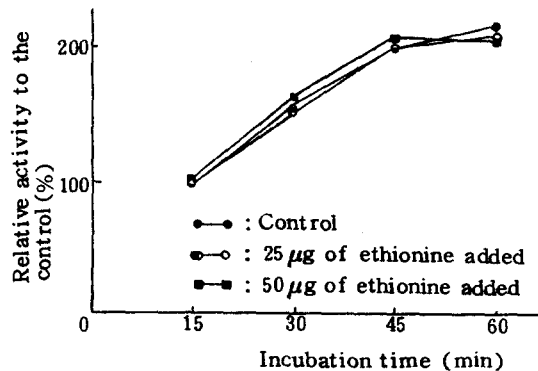


Fig. 1. Effect of ethionine "in vitro" on the hepatic xanthine oxidase activity of rat in various times.

Each value represents the mean of 5 experiments.

脂肪變性和 더불어 細胞의 壞死가 나타난다고 한다.<sup>21, 22)</sup> 한편 간염과 같은 간손상시와 CCl<sub>4</sub>에 의한 肝細胞 壞死와 같은 심한 간손상시 뿐만 아니라 脂肪變成과 같은 경미한 초기 肝損傷時에는 肝 및 血清中の XOD의 活性이 增加한다는 報告<sup>7)</sup>를 고려해 볼 때, ethionine 投與로 因하여 肝損傷이 誘導되었음에도 오히려 肝 XOD의 活性이 減少되는 것은 CCl<sub>4</sub>와는 달리 ethionine이 肝 XOD의 活性을 低下시키는 要因으로 作用하고 있음을 시사해 준다.

그러므로 ethionine 投與에 의한 肝 XOD 活性 低下 현상이 ethionine의 直接作用에 基因되어 나타나는지를 檢討할 目的으로 in vitro에서 實驗을 行하였을 때 別다른 變動이 觀察되지 않았다. 이러한 성적으로 보아 ethionine 投與에 의한 肝 XOD 活性減少 현상은 酸素에 直接作用함으로써 나타난 것이 아니라 ethionine의 간접적인 영향에 의한 것으로 생각되어 진다.

한편 ethionine 投與時의 肝 XOD 活性 變動이 生體內에서 m-RNA의 生合成을 抑制함으로써 蛋白 合成을 阻害하는 것으로 알려져 있는 actinomycin D<sup>23)</sup>를 實驗動物에 投與한 경우 및 低蛋白食餌群의 變動과 類似한 樣態인 점, 또한 ethionine을 實驗動物에 投與하였을 때 RNA의 合成이 低下된다는 Smuckler 等<sup>12)</sup>의 報告들을 綜合적으로 考察해 볼 때, ethionine 投與로 因한 肝 XOD 活性 變動은 RNA合成減少로 XOD 단백질의 선택적인 合成 저해가 야기된 것으로 思料되어지며, 이로 말미암아 CCl<sub>4</sub> 投與時와는 달리 肝損傷이 유발되었음에도 肝 XOD의 活性은 減少된 것으로 생각되어진다. 그러나 이 問題에 對해서는 追后 계속적인 研究 檢討가 行해져야 할 것으로 본다.

## V. 要約 및 結論

흰쥐에 DL-ethionine 投與時 xanthine oxidase 活性을 actinomycin D 및 CCl<sub>4</sub>를 投與한 경우와 低蛋白食餌로 成長한 實驗群과 相互 比較 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

Ethionine投與로 因한 肝 xanthine oxidase 活性은 對照群에 比하여 減少되는 傾向을 보였으며, 이때 血清 및 肝組織中 xanthine oxidase 活性은 그 程度差異는 있으나 actinomycin D를 投與한 경우

및 低蛋白食餌群과 類似한 變動樣相을 보였다. 그러나 CCl<sub>4</sub> 投與에 依한 肝 및 血清 xanthine oxidase 活性은 對照群에 比하여 有意한 增加를 보였다.

以上 實驗結果로 보아 ethionine投與에 依한 肝 xanthine oxidase 活性減少는 RNA합성合成依存 酵素蛋白合成의 抑制에 起因된 것으로 思料된다.

## 참고 문헌

1. Watts, R.W.E., Watts, J.E.M., and Seegmiller, J.E. : Xanthine oxidase activity in human tissue and its inhibition by allopurinol. *J. Lab. and Clin. Med.* 66(4), 668-697, 1965.
2. Shammaa, M.H., Nasrallah, S.M. and Al-khalidi, U.A.S. : Serum xanthine oxidase an experience with 2000 patients. *Digestive Disease.*, 18(1), 15-22, 1973
3. Ziegler, D.W., Hutchinson, H.D., and Kissling, R.E. : Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice. *Infect. and Immun.* 3(2), 237-242, 1971.
4. Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Croce, C. : Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious process. *Arzneim-Forsch. (Drug Res).*, 26 (12), 2185-2186, 1976.
5. Crosby, P.F., Matos, M.L. and Rivera-Collazo, E. : Liver xanthine oxidase activity of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 55: 673, 1969.
6. 尹鍾國 : 四鹽化炭素를 투여한 흰쥐에서의 간장 및 혈청 Xanthine Oxidase 활성변동, 과학논집(계명대학교 생활과학연구소) 6, 75-82, 1980.
7. 윤종국 : 흰쥐에 사염화탄소에 의한 간손상시 Actinomycin D 및 Prednisolon이 혈청 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향, 연구논집(계명대학교 기초과학연구소) 7(1), 113-123, 1988.
8. 윤종국, 강희양 : 低蛋白食餌로 成長한 흰쥐에 알콜의 급성 투여가 高尿酸血症에 미치는 영향. *대한보건의학회지*, 12(2) : 81-88, 1986.
9. Rowe, P.B. and Wyngaarden, J.B. : The

- mechanism of dietary alteration in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J. Biol. Chem.* 241(23), 5571-5576, 1966.
10. 尹鍾國 : 흰쥐에 西鹽化炭素 投與時 小腸 Xanthine oxidase 活性變動. *한국환경위생학회지*. 16(1), 67-74, 1990.
  11. Smuckler, E.A.: Iseri, O.A.: and Benditt, E.P.: Studies on carbon tetrachloride intoxication. I. The effect of carbontetrachloride on incorporation of labelled amino acid into plasma proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comum.*, 5: 270-275, 1961.
  12. Smuckler, E.A. and Koplitz, M.: The effect of carbon tetrachloride and ethionine on RNA synthesis in vivo and in isolated rat liver nuclei. *Arch. Biochem. Biophys.* 132: 62-79. 1969.
  13. 尹鍾國, 申重圭 : 흰쥐에 Ethionine 投與가 肝 및 血清中 Guanase 活性에 미치는 영향. *계명대학교 기초과학논집*, 8(2), 155-159, 1989.
  14. Yoon, C.G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal*, 2(Keimyung Technical College), 295-309, 1984.
  15. Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 244, 3855-3863, 1969.
  16. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determinaiton of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28: 56-63, 1957.
  17. Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, J.S. : Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 34: 126-131, 1955.
  18. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
  19. Farber, E., Simpson, M.V. and Tarver, H. : Studies on ethionine, 2. the interference with lipid metabolism *J. Biol. Chem.* 182: 91 99, 1950.
  20. Farber, E. and Segaloff, A.: Effect of androgens and growth and other hormones on ethionine fatty liver in rats. *J. Biol. Chem.* 216: 471-477, 1955.
  21. 尹鍾國 : 四鹽化炭素를 投與한 흰쥐에서의 肝臟 및 血清 Xanthine Oxidase 活性的變動, *科學論集(啓明大學校 生活科學 研究所)*, 6 : 75 -82, 1980.
  22. McCloskey, J.F. and McGehee, E. H.: Effect of subcutaneous and intraoral administration of CCL<sub>4</sub> on the liver of the rat, *Arch. Pathol.*, 49: 200-204, 1950.