

식이성 단백질 함량에 따른 환쥐에 사염화탄소 투여가 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향

윤종국[†] · 이상일^{*} · 신중규^{**}

계명대학교 공중보건학과

*계명전문대학 식품영양과

**경산대학 보건경제학과

Effect of Carbon Tetrachloride on the Changes of Xanthine Oxidase Activity in Rats Previously Fed Low or High Protein Diet

Chong-Guk Yoon[†], Sang-II Lee^{*} and Joong-Kyu Shin^{**}

Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-037, Korea

**Dept. of Health Economics, Kyungsan University, Kyungsan 712-715, Korea

Abstract

To evaluate an effect of liver xanthine oxidase on the induction of liver damage, carbon tetrachloride (CCl_4) was intraperitoneally injected twice at 0.1ml / 100g body weight to the rats fed a low (LP) or high protein diet (HP) while the control group fed LP or HP received only olive oil. The changing rate of liver xanthine oxidase activity was compared with that of a free radical generating enzyme, liver aniline hydroxylase and a scavenging enzyme, glutathione S-transferase activity between the rats fed a LP and those fed HP, and the two groups treated with CCl_4 . Concomitantly, the degree of liver damage which could be considered as the parameter for CCl_4 metabolism in case of CCl_4 -intoxicated animal was observed in the present experimental conditions and the effect of allopurinol, xanthine oxidase inhibitor, on the CCl_4 -toxicity of rats liver was also demonstrated. On the other hand, the comparative effect of actinomycin D on the liver and serum xanthine oxidase of CCl_4 -treated rats fed HP with that of those fed LP and the kinetics of purified liver enzyme from the liver of CCl_4 -treated rats fed HP was also compared with that of those fed LP to clarify the differences of xanthine oxidase activity between two groups. The increasing rate of liver weight / body wt, serum levels of ALT and the decreasing rate of hepatic ALT activity and protein contents to each control group were higher in CCl_4 -treated rats fed HP than those fed LP. Histopathological findings also showed more severe damage in CCl_4 -treated rats fed HP than those fed LP. Under the animal models as indentified by the present data herein, the liver xanthine oxidase activity was higher in CCl_4 -treated rats fed HP than those fed LP, and the control group fed HP also showed the much higher activity xanthine oxidase than that fed LP, whereas there were no differences in the activity of hepatic aniline

이 논문은 1990년도 문교부지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

^{*}To whom all correspondence should be addressed

hydroxylase and glutathione S-transferase between the two group treated with CCl₄.

Although the hepatic aniline hydroxylase activity was somewhat higher in the rats fed HP than those fed LP, the increasing rate of liver xanthine oxidase to the rats fed LP was higher in those fed HP than that of liver aniline hydroxylase. The degree of liver damage identified such as liver weight and serum ALT activity was less in the CCl₄-treated rats pretreated with allopurinol. These results suggest that even a system at which xanthine oxidase acts as well as the drug metabolizing enzyme may influence the acceleration of CCl₄ metabolism. In addition, the purified liver xanthine oxidase from CCl₄-treated rats fed HP showed decreased K_m value when compared to its control group. The K_m value of liver xanthine oxidase of CCl₄-treated rats fed LP showed a similar K_m value with its control group. Furthermore, the decreasing rate of liver and serum xanthine oxidase activity in CCl₄-treated rats pretreated with actinomycin D to the CCl₄-treated rats was higher in rats fed HP than in those fed LP. These results suggest that the induction of xanthine oxidase in CCl₄-treated rats fed HP may be greater than in those fed LP.

Key words : allopurinol, actinomycin D, aniline hydroxylase, glutathione S-transferase, high protein diet, low protein diet, xanthine oxidase

서 론

최근 경제 성장과 더불어 식생활의 향상에 수반된 육류와 같은 동물성식품의 섭취 증가에 산업의 급속한 발전에 따른 유해산업 공해물질의 변수가 작용하여 오히려 질병의 병발증 및 심화현상이 야기될 것으로 생각된다.

이들 유해산업 공해물질 중 xenobiotics의 일종인 사업화탄소(이하 CCl₄라 약함)는 간독소의 일종^{1~2)}으로 생체의 단백 영양상태에 따라서 그 독성발현에 상당한 차이가 나타남이 보고^{3~5)}되었으며, 특히 생체내에서 식이성 단백질과 CCl₄의 상호작용에 대해서는 오래 전부터 관심의 대상^{2,5~7)}이 되어 왔으나 이에 대한 병태생화학적 기전 구명에 대해서는 아직까지 불분명하다.

한편 xanthine oxidase(E.C. 1.2.3.2)는 purine, pyrimidine, pteridine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체내에서는 주로 purine체의 대사물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 요산(uric acid)을 생성하는데 촉매로 작용^{8~10)}한다.

또한 이 효소는 virus¹¹⁾, 세균¹²⁾, 기생충¹³⁾ 등의 감염 및 xenobiotics의 중독에 의한 간손상시에 간 또는 혈청 중에서 그 활성이 상승^{14~16)}한다고 하며, 실험동물에 식이성 단백질 함량이 증가될 때에도 간조직 중 본 효소의 활성이 증가됨이 많은 연구자들에 의하여 보고^{17~20)}되고 있다.

특히 본 효소가 생체의 방어기구에도 관여할 것이라는 보고¹²⁾가 있을 뿐만 아니라 Rajagopalan²¹⁾은

xenobiotics 대사에 xanthine oxidase가 관여할 것이라는 가설을 제시한 바 있다.

최근 윤 등¹⁸⁾은 실험동물에 고단백 식이조건 및 알콜의 병행투여시 뿐만 아니라 CCl₄에 의한 간손상시에도 고노산혈증이 야기¹⁹⁾되며, 이는 간조직의 xanthine oxidase 활성증가에 기인되어 나타난다고 보고^{5,18)}한 바 있다. 그러므로 단백식이 조건을 달리하여 성장시킨 실험동물에 CCl₄를 투여하여 간손상을 유도시킨 다음 xanthine oxidase의 활성변동을 관찰함은 xanthine oxidase가 CCl₄와 같은 xenobiotics의 대사에 관련성을 검토하는 일환으로서 뿐만 아니라 단백식이 조건에 따른 간손상의 정도에 비례하여 본 효소 활성증가의 원인 기전을 구명하는 기초자료를 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 흰쥐를 저단백(7%casein:LP) 및 고단백식이(20%casein:HP)으로 성장시킨 다음, CCl₄를 투여한 후 간무게, 간조직 중 단백질 함량과 alanine aminotransferase(이하 ALT라 약함) 활성을 혈청 및 간조직 중에서 측정함과 동시에 간조직의 병리조직검사를 실시하여 상호비교함으로서 간손상 정도를 관찰하였으며, 이때 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성을 측정하여 이를 성적을 LP군 및 HP군의 간손상 정도와 상호비교하였다.

또한 xanthine oxidase가 CCl₄대사와 관련되는지를 검토하는 일환으로 free radical 생성계 효소의 일종인 aniline hydroxylase활성²²⁾과 해독계에 관련된 간 glutathione 함량과 이의 포합효소인 glutathione S-transferase활성²³⁾을 간세포 중에서 측정하여 이들 효소활성 변동과 간 및 혈청 xanthine oxidase활성 변동

을 LP군과 HP군 간에 상호비교 검토함과 동시에 allopurinol을 전처리한 후 CCl₄를 투여한 xanthine oxidase 결핍 실험동물 모델에서 간손상 정도를 관찰 하므로서 CCl₄대사에 xanthine oxidase가 관련되는지를 관찰하였다. 그리고 단백식이조건에 따른 실험동물에 CCl₄투여시 xanthine oxidase 활성변동의 기전구명의 일환으로 본 실험 조건에서의 xanthine oxidase 활성에 미치는 actinomycin D의 효과와 간조직 중 xanthine oxidase를 정제한 후 효소활성의 반응속도론적 측면에서 관찰코자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 처치

실험동물은 체중이 130g 내외되는 의견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫흰쥐를 표준식이로 3일간 적응시킨 뒤 Table 1에 표시된 사료성분표의 식이로 저단백식이군(LP:7%casein)과 고단백식이군(HP:2% casein)으로 구분하여 약 1개월간 사육하였다.

고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육시킨 HP군 및 LP군 각 7마리에 50% CCl₄용액(v/v in olive oil) 일정량(0.1ml CCl₄/100g body weight)을 24시간 간격으로 2회 복강내로 투여하였다. Actinomycin D의 투여는 LP군 및 HP군의 각군에서 다시 4 groups, 즉 대조군, CCl₄투여군, actinomycin D와 CCl₄를 병행하여 투여한 군 및 actinomycin D만 투여한 군으로 나누어 CCl₄만을 투여한 동일 실험조건에 병행하여 실시하였으며 체중 100g 당 50μg^a의 actinomycin D를 CCl₄투여 1시간 전에 대퇴 외측근육에 주사하였다. 이때 actinomycin D군은 actinomycin D만 타군의 실험기간에 병행하여 투여하였으며 대조군은 olive oil만 투여하였다. 동물의 처치는 CCl₄, olive oil 또는 actinomycin D의 마지막 투여 후 24시간에 시행하였다. 동물을 절식시킨 후, ether 마취하에서 복부정중선을 따라 개복한 다음, 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 채혈직후 2~4℃의 생리식염수로 간을 관류(灌流)하여 간조직 내에 남아있는 혈액을 제거한 후 적출하였다. 적출한 간장은 생리식염수로 씻은 다음 여지로 압박하여 간에 남아있는 생리식염수를 제거하여 무게를 측정하였다.

그리고 간의 일부는 병리조직검사를 위하여 10% formalin에 고정시켰다. 한편 채취한 혈액은 원심분리

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

Ingredients	Low protein diet	High protein diet
Casein	70	200
Corn starch	804.36	674.36
Corn oil	54.8	54.8
Vitamin A & D mixture ^a	10.2	10.2
Vitamin E & K mixture ^b	2	2
Water soluble vitamin mixture ^c	3	3
Vitamin B ₁₂ ^d	1	1
Salt mixture ^e	40	40
α -Cellulose	20	20

*408.1 Kcal

^a) Vitamin A & D mixture : 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100ml of corn oil

^b) Vitamin E & K mixture : 5g of α-tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200ml of corn oil

^c) Water soluble vitamin mixture : contained(mg) ; choline chloride 2,000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-panthothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100

^d) Vitamin B₁₂ : 5mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500ml of distilled water

^e) Salt mixture : contained(g) ; CaCO₃ 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSO₄ 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl₂ 0.25, CuSO₄ · 5H₂O 0.3, MnSO₄ 5, molybdic acid 0.2

하여 혈청을 얻고, 간과 더불어 생화학실험에 사용하였다.

간조직의 효소액 조제

일정량의 간조직을 취하여 4배량의 0.25M sucrose액을 가해 glass teflon homogenizer로 4℃ 내외를 유지하면서 마쇄하여 간 마쇄균질액(20%w/v)을 만들었다. 이 마쇄균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 혼 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria분획을 제거한 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction과 microsomal fraction을 분리하였다. Cytosolic fraction은 xanthine oxidase, ALT 및 glutathione S-transfer-ase 활성 측정의 효소원으로 사용하였으며, microsomal fraction은 aniline hydroxylase 활성 측정의 효소원으로 하였다.

간 xanthine oxidase의 정제

간조직 중 xanthine oxidase를 Row 등의 방법¹³에 준해 cytosolic fraction을 열처리, ammonium sulfate fractionation, acetone 처리 및 투석과정을 거쳐 부분정제한 다음, 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.8)로 평형시킨 hydroxyapatite (Sigma제) column ($1.2 \times 10\text{cm}$)에 주입하고 stepwise gradient 방법으로 phosphate의 농도를 0.05M에서 0.25M까지 증가시켜 가면서 유출시켜 정제된 xanthine oxidase를 얻었다.

간조직의 glutathione 함량측정

간조직 일정량에 생리식염수 9배량을 가하고 glass teflon homogenizer로 마쇄하여 얻은 간균질액 (10%~w/v)을 사용하여 glutathione 함량을 Ellman의 방법²⁴에 의하여 측정하였다. Glutathione의 함량은 간조직 g당 μmoles 로 표시하였다.

효소활성측정

Xanthine oxidase 활성측정은 Della Corte 등 방법²⁵ 및 윤의 방법²⁶에 따라 시행하였으며 효소단위는 간조직에서는 기질로부터 1분 동안에 생성된 요산의 양을 효소액 중 함유된 단백질 1mg당 nmoles, 또는 체중 100g당 unit로 표시하였으며, 혈청중에서는 혈청 1L당 μmoles 로 표시하였다. Aniline hydroxylase의 활성측정은 Kato 등의 방법²⁷에 의하여 시행하였으며 효소활성단위는 1시간 당 단백 1mg이 기질인 aniline으로부터 생성시킨 p-aminophenol의 nmoles로 표시하였다. Glutathione S-transferase의 활성은 Habig 등의 방법²⁸에 의하여 측정하였으며 효소활성단위는 기질인 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene 및 glutathione으로부터 생성된 conjugate의 양을 nmoles로 나타내었다. 혈청 및 간조직 중 alanine aminotransferase(이하 ALT라 약함) 활성 측정은 Reitman과 Frankel의 방법²⁹에 의하였으며 효소활성단위는 단백 mg당 혹은 혈청 1ml당 karmen unit³⁰로 표시하였다.

간조직의 병리조직검사

10% formalin에 고정된 조직을 탈수, 포매과정을 거쳐 5 μm 의 두께로 박절하고 hematoxylin-eosin 염색 후 광학현미경으로 관찰³¹하였다.

간 조직의 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법³²에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우에는 student t-검정법에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

성장기간 동안 체중의 변동

Casein으로 식이중 단백함량을 달리하여 실험동물을 성장시켰을 때 HP군의 성장율이 LP군 보다 높게 나타났다 (Fig. 1). 이는 타 연구자들의 보고^{5, 18}와 유사하였다. 따라서 본 실험 조건이 저단백 및 고단백 식이 조건의 실험모델로 확인되었다.

식이성 단백함량을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 CCl₄투여가 간손상에 미치는 영향

실험동물에 CCl₄투여시 간손상의 정도가 식이성 단백함량에 따라 다르게 나타난다고 보고⁹되고 있다.

본 실험조건에서도 사염화탄소 투여로 인한 체중당 간무게의 변동율에 있어서 HP군은 대조군에 비하여 약 45% ($p < 0.001$) 증가를 보였으며, LP군은 약 30% ($p < 0.001$)의 증가를 나타내어 HP군이 LP군 보다 CCl₄투여로 인한 간무게 증가율이 높게 나타남을 알 수 있었다 (Table 2).

그리고 CCl₄투여로 인한 간조직 중 단백질함량은 LP군은 대조군에 비하여 감소되는 경향을 나타내었으나 HP군은 대조군에 비하여 약 27%의 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보여 CCl₄투여로 인한 간 단백질함량

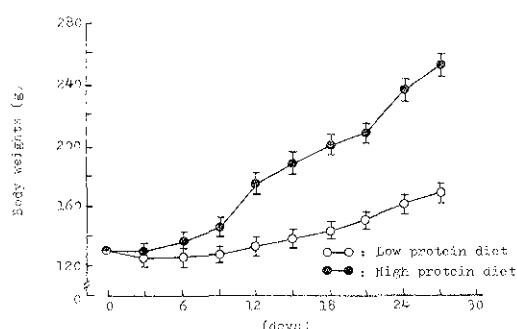


Fig. 1. One month weight gain in rats fed a low or high protein diet. Each value is the mean \pm SE for 14 rats.

Table 2. Effect of CCl₄ treatment on the weights of liver / body weight, hepatic protein contents and serum and liver ALT levels in rats fed a low or high protein diet

Group	Low protein diet		High protein diet	
	Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
Liver weight / body wt (%)	3.20± 0.06	4.15± 0.08*** ^{b)}	3.08± 0.09	4.46± 0.11*** ^{b)}
Liver protein contents (mg / g wet. liver)	127.60± 17.51	111.60± 2.91	152.20± 5.60	111.40± 3.90*** ^{b)}
Hepatic ALT activities (Karmen unit / mg protein)	258.47± 7.90*** ^{a)}	248.40± 11.20	355.01± 2.40	230.44± 2.41*** ^{b)}
Serum ALT activities (Karmen unit / ml. serum)	21.98± 2.88	119.40± 22.56*** ^{b)}	23.67± 2.40	210.30± 23.90*** ^{b)}

Each group received intraperitoneally 0.1ml of 50% CCl₄ (v/v in olive oil)

After 24hr, the CCl₄ treatment was done once more, and the animals were sacrificed 24hr later

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats

***^{a)} Significantly different from the control group fed a high protein diet (p<0.001)

***^{b)} Significantly different from the control group (p<0.001)

감소율에 있어서 HP군이 LP군 보다 높게 나타남이 관찰되었다. 또한 급성 간손상시 그 활성치가 혈청중에서는 증가되며 간에서는 감소한다는 ALT¹⁶의 간조직증 활성치는 CCl₄투여시 LP군에서는 대조군과 별 다른 차이를 관찰할 수 없었으나, HP군에서는 대조군에 비해 약 36%의 유의한(p<0.001) 감소를 보였다.

한편 CCl₄투여시 혈청중 ALT활성도는 LP군에서는 대조군에 비해 약 5.4배의 유의한(p<0.001) 증가를 나타내었고, HP군에서는 대조군에 비해 약 8.9배의 현저한 증가를 보여, CCl₄투여로 인한 혈청 ALT활성 증가율이 LP군보다 HP군에 있어서 높게 나타남을 알 수 있었다(Table 2).

한편 간조직의 병리조직학적 소견에 있어서는 olive oil만 주사한 대조군의 간조직은 실질세포와 중심정맥을 포함하는 간소엽들이 잘 보존되어 특이한 변화가 없었으며, CCl₄를 투여한 간조직의 소견은 LP군에서는 간세포내 지방성이 많이 축적되어 있는 지방변성을 관찰할 수 있었고 HP군에서는 지방변성을 수반한 괴사세포(necrotic cell)들이 많이 관찰되었다(Fig. 2). 이상 실험성적을 종합하여 볼때 HP군이 LP군 보다 CCl₄ 투여로 인한 간손상이 더욱더 심하게 나타남을 알 수 있었다.

급성 간손상시 간 세포의 괴사로 인하여 핵의 분해(karyolysis)가 초래²³된다고 하며 Smucker 등²⁴은 실험동물에 CCl₄투여시 간조직의 ATP가 감소된다고 하였다. 따라서 간손상시 ATP감소는 일련의 purine체 분해대사를 촉진시키므로서 purine체 최종 분해과정

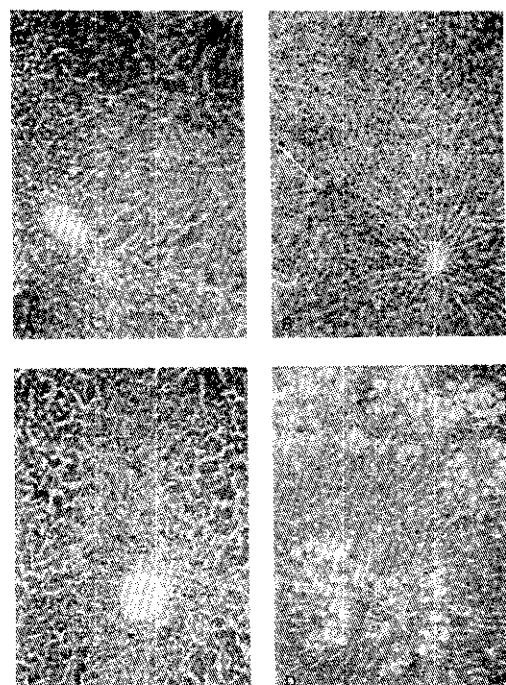


Fig. 2. Light microscopic liver pathological findings in CCl₄-treated rats fed a low or high protein diet and that of its control group.

- A. The liver lobules are well preserved. H & E, ×100 (LC)
- B. The liver cells are regularly arranged. H & E, ×100 (SC)
- C. Centrolobular degenerative with microvesicular lipid droplets are seen. H & E, ×100 (LT)
- D. Shrinkened central vein and centrolobular necrosis with vacuolation are seen. H & E, ×100 (ST)

에 관여하는 xanthine oxidase의 활성이 높게 나타날 것으로 생각되며, 이와 같은 현상은 LP군 보다 간손상이 심한 HP군에서 보다 더 활발히 이루어질 것으로 생각되어 본 실험조건에서 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성을 측정하였다.

간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성변동

단백식이조전에 따른 실험동물에 CCl₄투여시 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성 변동을 나타낸 것이 Table 3이다.

본 실험에서 LP군의 간 xanthine oxidase 비활성도는 HP군 보다 약 62% 감소되었다($p<0.001$).

이 결과는 타 연구자들의 성적^{17~20}과 유사하였다. 또한 간조직을 정제한 xanthine oxidase의 활성도 역시 LP군이 HP군 보다 현저하게 감소되었으며, 이를 체중 100g당 효소활성치로 환산하였을 때도 이와 유사하였다. 한편 CCl₄를 투여하였을 때 HP군의 CCl₄ 투여군은 LP군의 CCl₄ 투여군 보다 간 xanthine oxidase 비활성도가 약 27% 증가되었으며 체중 100g 당 효소활성치로 환산한 경우에는 약 57%의 유의한 ($p<0.01$) 증가를 나타내었다. 그리고 정제한 간조직의 xanthine oxidase 비활성도 역시 HP군이 LP군 보다 약 91%의 현저한 증가를 나타내었다. 특히 CCl₄ 투여로 대조군에 대한 혈청 xanthine oxidase 활성 증가율은 HP군이 LP군 보다 약 1.7배 증가되었다.

따라서 본 실험조건에서 고단백식이군에서 xanthine oxidase 활성이 저단백식이군 보다 높을 뿐만 아니라 CCl₄투여시에도 본 효소의 활성이 고단백식이군에서 더 높게 나타남을 알 수 있었다.

Xanthine oxidase는 purine체 분해대사의 최종단계에서 hypoxanthine으로부터 xanthine, xanthine으로부터 요산을 생성하는데 관여하는 효소^{8~10}로서 CCl₄투여로 인한 급성 간손상시 xanthine oxidase 활성이 증가^{14~16}된다고 한다. 간손상시 xanthine oxidase 활성 증가현상은 핵산성 물질의 다량파괴에 따른 기질성 유도작용에 기인되며, 혈청중 본 효소의 활성 증가는 손상된 간세포의 투과성 항진에 의하여 초래됨이 보고¹⁵되었다. 따라서 본 실험조건에서 CCl₄투여로 인한 간조직 중 xanthine oxidase 활성치와 혈청 중 xanthine oxidase의 대조군에 대한 활성증가율에 있어서 HP군이 LP군 보다 높게 나타남은 HP군이 LP군 보다 간손상이 더 심화된 결과로 생각할 수 있다. 그러므로 식이성 단백함량에 따른 간손상 정도에 비례하여 xanthine oxidase 효소 단백의 합성유도가 달리 나타나는지를 검토하는 일환으로 본 실험조건에서 mRNA합성을 억제하여 단백합성을 억제하는 것으로 알려져 있는 actinomycin D²¹를 전처치한 다음, CCl₄를 투여한 후 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성을 측정하여 나타낸 것이 Fig. 3이다.

HP군에서 actinomycin D 전처리 후 CCl₄투여군이 CCl₄만 투여한 실험군에 비하여 간 xanthine oxidase

Table 3. Effect of CCl₄ treatment on the xanthine oxidase activities in sera and liver of rats fed a low or high protein diet

Specimens	Group	Low protein diet		High protein diet	
		Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
Unit / mg of protein		1.20±0.09*** ^a	2.75±0.150*** ^b	3.12±0.30	3.50±0.33
Liver unit / 100g body wt.		285.37±9.51*** ^a	721.03±38.02*** ^b	910.00±48.50	1132.00±97.00*** ^c
Purified enzyme		58.29	260.28	309.58	480.55
Serum unit / l.		26.33±1.08	32.07±1.2** ^b	23.65±2.91	47.40±5.19** ^b , ** ^c

The conditions of animal treatment are the same as described in the Table 2

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats

The values of purified enzyme from pooled specimen in each group are the mean of 3 experiment

Xanthine oxidase unit : n mole uric acid/min

***^a Significantly different from the control group fed high protein diet ($p<0.001$)

**^b Significantly different from the control group ($p<0.01$)

***^b Significantly different from the control group ($p<0.001$)

*^c Significantly different from the CCl₄-treated group fed low protein diet ($p<0.05$)

***^c Significantly different from the CCl₄-treated group fed low protein diet ($p<0.001$)

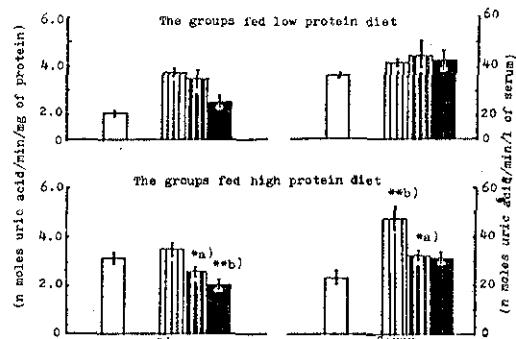


Fig. 3. Effect of actinomycin D pretreatment on the serum and liver xanthine oxidase activity in CCl_4 -treated rats fed a low or high protein diet.

Actinomycin D ($50\mu\text{g}/100\text{g}$ body wt) was given an hour before intraperitoneal injection of CCl_4 (0.1ml of $50\%/\text{100g}$ body wt) after that of 18 hours, the same method was done once more as above and then 24 hours later, the animals were sacrificed. The vertical bars are expressed as the mean \pm SE with 7 rats in control group and CCl_4 -treated group, 5 rats in CCl_4 -treated group pretreated with actinomycin D and 6 rats in actinomycin D treated group.

□ ; Control, □□ ; CCl_4 , □■ ; CCl_4 + actinomycin D, ■ ; Actinomycin D

*a Significantly different from the CCl_4 -treated group
*b Significantly different from the control group

$*p < 0.05$, $**p < 0.01$

활성이 약 27%의 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였으며, 혈청 xanthine oxidase 활성은 약 31%의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다. 그리고 actinomycin D만 투여한 실험군이 역시 대조군에 비하여 xanthine oxidase 활성이 약 36%의 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였다. 그러나 LP군에 있어서는 actinomycin D 전처리 후 CCl_4 를 투여한 군에 있어서 간 xanthine oxidase 활성이 CCl_4 만 투여한 실험군에 비하여 감소되는 경향을 보였으나 actinomycin D 투여군과 대조군 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다.

이같이 HP군이 LP군에 비해서 xanthine oxidase 활성에 대한 actinomycin D의 작용이 민감한 결과로 보아서, CCl_4 투여에 의한 간손상시 HP군이 LP군보다 xanthine oxidase 효소단백 함성을 높게 나타남을 암시해 주고 있다.

더우기 본 실험에서 간조직 xanthine oxidase를 여러 단계를 거쳐 부분정제한 다음 최종적으로 hydro-

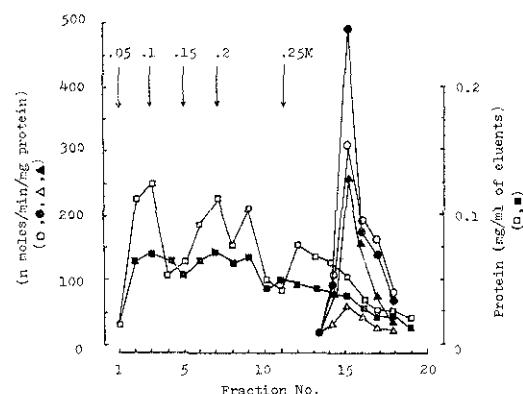


Fig. 4. Hydroxyapatite column chromatography of xanthine oxidase from liver of rats fed a low or high protein diet.

Partial purified liver xanthine oxidase of each group were applied to the hydroxyapatite column ($1.2 \times 10\text{cm}$) and were eluted with a step wise gradient of potassium phosphate ($50\sim 250\text{mM}$), pH 7.8. Fraction of 5ml volume were collected and assayed for xanthine oxidase activity.

- △ - ; Low protein
- ▲ - ; Low protein + CCl_4
- ○ - ; High protein
- ● - ; High protein + CCl_4
- ■ - ; Low protein
- □ - ; High protein

xyapatite column을 통해 정제시킨 효소 (Fig. 4)를 이용하여 기질의 농도를 변화시켜 가면서 효소활성을 측정하는 효소동력학적인 측면에서 관찰하였을 때 LP군의 V_{max} 치는 CCl_4 투여군이 대조군에 비해 약 2.7배, HP군에서는 약 1.8배 정도로 LP군에서 그 증가율이 높게 나타났다.

그러나 CCl_4 를 투여한 양 실험군 사이의 V_{max} 치를 비교하였을 때 HP군에서 LP군에 비하여 약 7.6배 정도 현저히 높게 나타났다. 한편 K_m 치는 LP군에서는 CCl_4 를 투여하여도 별다른 차이를 볼 수 없었으나 HP군에서는 CCl_4 를 투여함으로서 약 50%정도 감소되었다 (Fig. 5).

따라서 CCl_4 투여에 의한 간손상시 HP군이 LP군보다 간 및 혈청의 xanthine oxidase 활성이 증가되는 것은 HP군이 LP군 보다 간손상 정도가 심하여 혼산성 물질의 다량 파괴에 따른 기질성 유도작용에 의하여 xanthine oxidase 효소단백 함성을 LP군에 비하여 HP군에서 높기 때문인 것으로 생각된다.

또한 본 실험에서 CCl_4 투여에 의한 대조군에 대한

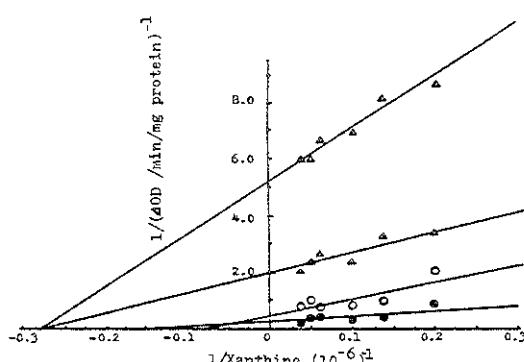


Fig. 5. Reciprocal plots of hepatic xanthine oxidase with xanthine as a substrate in control and CCl₄-treated rats fed a low or high protein diet.

Each value represents the mean of 3 experiments with the purified enzyme from pooled liver of each group.

- △ - ; Low protein
- ▲ - ; Low protein + CCl₄
- ○ - ; High protein
- ● - ; High protein + CCl₄

간 xanthine oxidase 활성 증가율이 HP군보다 LP군이 높은 점과 혈청 중 xanthine oxidase 활성 증가율에 있어서 HP군이 LP군 보다 높게 나타난 결과는 HP군에 있어서 간 손상 정도가 LP군 보다 심하게 나타남으로써 야기된 결과로 생각된다.

간조직 중 aniline hydroxylase와 glutathione S-transferase 활성 및 glutathione 함량 변동

현재까지 보고에 의하면 CCl₄에 의한 간손상은 CCl₄ 자체에 의한 독작용이 아니라 SER막에 존재하는 지용성 약물대사기구인 복합산화효소계의 cytochrome P450에 의하여 CCl₄가 free radical (trichloromethyl radical, CCl₃[·])로 변하여 생체막의 지질성분을 과산화시키므로서 야기^{22, 25, 36}된다고 한다. 또한 실험동물의 식이 중 단백질함량을 높일 때 cytochrome P450에 상응하는 aniline hydroxylase 활성이 높게 나타남이 윤 등²³ 및 타연구자들^{31, 38}에 의하여 보고되었다.

따라서 HP군이 LP군 보다 CCl₄에 의한 간손상이 더 심하게 야기됨은 CCl₄의 대사율이 LP군 보다 HP군이 유지되기 때문인 것으로 생각된다. 그리고 CCl₄와 같은 xenobiotics 대사에 복합산화효소계인 cytochrome P450 이외 비특이적 효소의 일종인 xanthine oxidase

가 관여할 것이라는 Rajagopalan²¹의 가설과 식이 중 단백질함량 증가에 비례해서 간 xanthine oxidase 활성이 증가^{17~20}된다는 점을 고려해 볼 때 CCl₄ 대사에 xanthine oxidase 효소반응 기구가 관련될 것으로 생각되어 본 실험조건에서 간조직 중 xanthine oxidase 활성과 병행해서 aniline hydroxylase 활성을 측정한 성적이 Table 3과 4이다.

간 aniline hydroxylase 활성은 HP군이 LP군에 비하여 약 84%의 유의한 ($p < 0.01$) 증가를 보였으며 간 xanthine oxidase 활성은 HP군이 LP군에 비해서 약 160의 현저한 증가를 나타내었다. 그러므로 식이성 단백에 xanthine oxidase가 aniline hydroxylase 보다 더 민감한 작용을 나타내는 것을 알 수 있다. 더욱이 CCl₄ 투여로 인한 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성에 있어서는 HP군이 LP군 보다 유의하게 증가되었으나 CCl₄ 투여시 그 활성이 감소된다는 간 aniline hydroxylase 활성은 두 군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다.

이와 같은 실험결과는 CCl₄ 대사에 cytochrome P450 약물대사효소 이외 xanthine oxidase도 어느 정도 관여함을 암시해 주고 있다.

일반적으로 조직의 손상은 free radical 생성과 해독계 사이의 불균형에 의하여 야기^{39, 40}되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 실험에서와 같이 단백식이 조건에서 해독계에 속하는 glutathione 및 이의 포함효소인 glutathione S-transferase 활성을 측정하여 얻은 성적이 Table 4이다.

HP군에 있어서 간 glutathione 함량은 LP군 보다 약 50% 증가되었으며 간 glutathione S-transferase 활성은 HP군과 LP군간에 별 다른 차이를 나타내지 않았으며 CCl₄ 투여로 인한 본 효소 활성치는 두 군간에 역시 별 다른 차이를 관찰할 수 없었다.

이 실험결과로 보아 본 실험조건에서 HP군이 LP군 보다 간손상이 심한 것은 약물대사의 해독계와는 무관한 것으로 생각된다.

이상 성적을 종합하여 볼 때 HP군이 LP군 보다 CCl₄에 의한 간손상 정도가 심화된 것은 식이 중 단백 함량 증가로 free radical 생성에 관여하는 효소인 xanthine oxidase의 활성이 높게 유지되기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 xanthine oxidase가 CCl₄ 대사에 관련되는지를 검토하는 일환으로 xanthine oxidase 억제제로 알려져 있는 allopurinol²²을 전처치한 다음 CCl₄ 투여시 CCl₄ 대사의 저표로 볼 수 있는

Table 4. Effect of dietary protein on the activity of hepatic aniline hydroxylase, glutathione S-transferase and the content of hepatic glutathione in CCl₄-treated rats

Experiments	Groups	Low protein diet		High protein diet	
		Control	CCl ₄	Control	CCl ₄
Hepatic aniline hydroxylase ^{a)}		33.41 ± 6.70	12.28 ± 6.5 ^{*b)}	61.50 ± 6.3 ^{**a)}	11.78 ± 3.58 ^{***b)}
Hepatic glutathione S-transferase ^{b)}		556.38 ± 30.94	427.08 ± 11.37 ^{**b)}	537.96 ± 67.27	423.48 ± 24.01
Hepatic glutathione ^{c)}		3.20 ± 0.21	4.70 ± 0.43 ^{**b)}	4.90 ± 0.57 ^{*a)}	6.07 ± 0.48 ^{*a)}

^{a)} p-aminophenol n moles / mg protein / hr^{b)} n moles / mg protein / min^{c)} μ moles / g of tissue

Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats

^{*b)} Significantly different from the control group ($p < 0.05$)^{**b)} Significantly different from the control group ($p < 0.01$)^{***b)} Significantly different from the control group ($p < 0.001$)^{*a)} Significantly different from the low protein group ($p < 0.05$)^{**a)} Significantly different from the low protein group ($p < 0.01$)^{*c)} Significantly different from the low protein group treated with CCl₄**Table 5. Effect of allopurinol pretreatment on the levels of serum ALT, liver weight per body weight and liver xanthine oxidase activity in CCl₄-treated rats**

Treatment	Liver xanthine oxidase	Serum AT	% (liver wt / body wt)
Control (7)	3.12 ± 0.30	23.67 ± 2.40	3.08 ± 0.09
CCl ₄ (7)	3.50 ± 0.33	210.30 ± 23.90	4.46 ± 0.11
Allopurinol (6)	1.48 ± 0.07 ^{***a)}	82.17 ± 2.60 ^{**a)}	2.99 ± 0.14
Allo. + CCl ₄ (6)	1.03 ± 0.12 ^{***b)}	150.00 ± 8.55 ^{**b)}	4.07 ± 0.16

Each value represents the mean ± S.E. of numbers in parenthesis

^{***a)} Significantly different from the control group ($p < 0.001$)^{*b)} Significantly different from the CCl₄-treated group ($p < 0.05$)^{***b)} Significantly different from the CCl₄-treated group ($p < 0.001$)The rat received allopurinol (50mg / kg, ip) 2hr before the administration of CCl₄

Liver xanthine oxidase unit : n mole uric acid / min / mg of protein

ALT unit : Karmen unit / ml of serum

간손상 정도를 CCl₄만 투여한 경우와 비교검토하였다.

요약

Allopurinol과 CCl₄의 병행투여가 간손상에 미치는 영향

Allopurinol전처리후 CCl₄투여군은 CCl₄만 투여한 실험군에 비하여 간 xanthine oxidase가 약 70%의 현저한 감소를 나타낸 실험동물 모델에서 allopurinol 전처리군이 CCl₄투여군에 비하여 체중당 간무게가 감소되는 경향을 보였으며 혈청 ALT활성도 약 29% 유의하게 ($p < 0.05$) 감소되었다(Table 5). 이러한 성적으로 보아 xanthine oxidase의 활성과 CCl₄의 대사 간에는 밀접한 관련성이 있음을 시사해 주고 있다.

CCl₄에 의한 간손상의 병태생리와 xanthine oxidase 효소의 관련 여부를 검토하는 일환으로 흰쥐를 저단백(7% casein) 및 고단백식이(20% casein)으로 성장시킨 다음 50% CCl₄ (v/v in olive oil)를 복강내에 주사후 간손상 정도를 비교함과 동시에 간조직의 free radical 생성제 및 해독제에 관련된 효소 활성과 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성을 측정하여 이를 성적을 상호비교 검토하였다. 또한 xanthine oxidase가 CCl₄에 의한 간손상에 관련되는지를 확인할 목적으로 allopurinol 전처리한 다음 CCl₄를 투여한 xanthine

oxidase 결핍모델에서 간손상 정도를 CCl₄투여군과 비교검토하는 한편, HP군에서 LP군보다 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성이 증가되는 원인을 구명하는 일환으로 actinomycin D 효과와 본 효소를 간조직 중에서 정제한 후 반응속도면에서 검토하였다.

HP군에서 CCl₄투여로 인한 간무게, 혈장 alanine aminotransferase(ALT) 활성 증가율과 간 ALT 및 단백질 함량 감소율이 LP군 보다 높았으며, 병리조직학적 검사소견에서도 HP군에서 LP군 보다 간손상 정도가 높게 나타남이 확인되었다. 이러한 실험모델에서 HP군의 대조군 및 CCl₄투여군 모두 LP군의 대조군 및 CCl₄투여군 보다 간과 혈청 xanthine oxidase 활성이 대체적으로 증가되었으며 간 aniline hydroxylase 활성 및 glutathione 함량 역시 HP군이 LP군 보다 높게 나타났다. 그러나 CCl₄투여군에 있어서 간 aniline hydroxylase와 glutathione S-transferase 활성은 두 군간에 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그리고 allopurinol을 전처치한 후 CCl₄ 투여시에 혈장 ALT 및 체중당 간무개는 CCl₄만 투여한 실험군 보다 감소되었다. 한편 간조직을 정제한 xanthine oxidase 활성에 있어서 대조군 및 CCl₄투여군 모두 HP군이 LP군 보다 본 효소의 활성이 높게 나타났으며, V_{max} 역시 HP군이 LP군 보다 높았다. LP군에 있어서 K_m치는 대조군과 CCl₄투여군 간에 별다른 차이를 볼 수 없었으나 HP군의 K_m치는 CCl₄투여군이 대조군 보다 감소되었다. 그리고 actinomycin D 전처치후 CCl₄를 투여한 경우에는 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성 감소율이 HP에서 LP군 보다 더 높게 나타났다.

이상 성격을 종합해 볼 때 실험동물에 식이성단백질 함량을 높일 때 CCl₄로 인한 간손상이 심하게 나타남과 동시에 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성이 증가되는 점과 xanthine oxidase 활성 억제제인 allopurinol이 CCl₄의 간독성을 억제시키는 현상은 CCl₄대사에 약물대사효소 이외 xanthine oxidase도 관여할 것이라는 것을 시사해 주고 있다.

문 헌

- Matsubara, T., Mori, S., Touchi, A., Masuda, Y. and Takeuchi, Y. : Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. : Evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. *J. Pharmacol.*, **33**, 435(1983)
- Drill, V. A. : Hepatotoxic agents. : Mechanism

- of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**, 1(1952)
- Park, W. I. : Effects of clofibrats on carbon tetrachloride induced fatty liver on rats. *J. Seoul Medicine*, **10**, 49(1969)
 - Plaa, G. L. : Toxic response of the liver. In "Casarett and Doull's toxicology" Klaassen, C. D. (ed.), Macmillan Publishing Company, New York, p. 286(1986)
 - Yoon, C. G., Kang, H. Y. and Lee, S. I. : Effect of carbon tetrachloride on the activity of aniline hydroxylase in rats fed on a low protein diet. *J. Institute Natural Science (The Institute of Natural Science Keimyung University, Taegu, Korea)*, **7**, 125(1988)
 - Drill, V. A., Loomis, T. A. and Belford, J. : Effect of protein-carbohydrate intake on liver injury. : Produced in dogs by carbon tetrachloride. *J. Industrial Hygiene Toxicology*, **29**, 180(1947)
 - Campbell, T. C. and Hayes, J. R. : Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme system. *Pharmacol. Reviews*, **26**(3), 171(1974)
 - Krenitsky, T. A. : Xanthine oxidase and aldehyde oxidase in purine and purine analogue metabolism. *Exp. Med. Biol.*, **41**, 57(1973)
 - Ramber, C. R. H. : A sensitive and nonradioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **74**, 828(1969)
 - Duke, E. J., Joyce, P. and Ryan, J. P. : Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem. J.*, **131**, 187(1973)
 - Ziegler, D. W., Hutchinson, H. D. and Kissling, R. E. : Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice. *Infection and Immunity*, **3**(2), 237(1971)
 - Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Gorce, C. : Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Arzneim-Forsch. (Drug Res.)*, **26**(12), 2185(1976)
 - Crossby, P. F., Matos, M. L. and Rivera-Collazo, E. : Liver xanthine oxidase activity of mice infected with Schistosoma mansoni. *J. Parasit.*, **55**, 673(1969)
 - 윤종국 : 사염화탄소를 투여한 흰쥐에서의 간장 및 혈청 xanthine oxidase 활성변동. 과학논집 (계명대학교 생활과학연구소), **6**, 75(1980)
 - 윤종국, 신중규 : 흰쥐에 사염화탄소 투여가 혈액 및 노중 노산함량에 미치는 영향. 대한보건협회지, **15**(2), 13(1989)
 - 윤종국 : 흰쥐에 사염화탄소에 의한 간손상시 actinomycin D 및 prednisolone이 혈청 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. 연구논집 (계명대학교 기초과학 연구소), **7**(1), 113(1988)
 - Rowe, P. B. and Wyngaarden, J. B. : The

- mechanism of dietary alteration in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J. Biol. Chem.*, **241**, 5571 (1966)
18. Kang, H. Y. and Yoon, C. G. : Effect of the peritoneal injection of alcohol on hyperuricemia in rats previously fed low protein diet. *J. Korean Publ. Hlth. Asso.*, **12**(2), 81(1986)
 19. Hevia, P. and Clifford, A. J. : Protein intake, hepatic purine enzyme levels and uric acid production in growing chicks. *J. Nutr.*, **108**, 46 (1978)
 20. Furth-Walker, D. and Amy, N. K. : Regulation of xanthine oxidase activity and immunologically detectable protein in rats in response to dietary protein and iron. *J. Nutr.*, **117**, 1697(1987)
 21. Rajagopalan, K. V. : Xanthine oxidase and aldehyde oxidase in enzymatic basis of detoxication. Jakoby, W. B., (ed.), Vol. 1, Academic press, N. Y. p.295(1980)
 22. Freeman, B. A. and Crapo, J. D. : Biology of disease. : Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412(1982)
 23. Boyland, E. and Chasseud, L. F. : The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **32**, 173 (1969)
 24. Ellman, G. L. : Tissue sulphhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70(1959)
 25. Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855(1969)
 26. Yoon, C. G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal*(Keimyung Junior College), **2**, 295(1984)
 27. Kato, N., Tani, T. and Yoshida, A. : Effect of dietary level of protein on liver microsomal drug-metabolizing enzymes, urinary ascorbic acid and lipid metabolism in rats fed PCB containing diets. *J. Nutr.*, **110**, 1686(1980)
 28. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferases : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130(1974)
 29. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58(1957)
 30. Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, J. S. : Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.*, **34**, 126(1955)
 31. Ambrogi, L. P. : Manual of histologic and special staining technics. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C. (1975)
 32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 33. Robbins, S. L. and Kumar, V. K. : Basic pathology. Saunders, p.14 (1987)
 34. Smuckler, E. A. and Koplitz, M. : The effects of carbon tetrachloride and ethionine on RNA synthesis in vivo and in isolated rat liver nuclei. *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**, 62(1969)
 35. Righetti, A. B. B. and Kaplan, M. M. : Effect of actinomycin D on the rat liver alkaline phosphatase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**, 491 (1971)
 36. Simon, R. H., Scoggin, C. M. and Patterson, D. : Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7181(1981)
 37. Campbell, R. M. and Kosterlitz, H. W. : The effects of short term changes in dietary proteins on the response of the liver to carbon tetrachloride. *Brit. J. Exp. Path.*, **29**, 149(1948)
 38. McLean, A. E. M. and McLean, E. K. : The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem. J.*, **100**, 564(1966)
 39. Chow, C. K. and Tappel, A. L. : Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J. Nutr.*, **104**, 444(1974)
 40. Leibovitz, B. E. and Siegel, B. V. : Aspects of free radical reaction in biological system. : Aging. *J. Gerontol.*, **35**, 45(1980)
 41. Klinenberg, J. R., Goldfinger, S. E. and Seegmiller, J. E. : The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol in the treatment of gout. *Annals of Internal Medicine*, **62**, 639(1965)

(1991년 8월 22일 접수)