

단백식이 조건을 달리하여 성장한 흰쥐에 Methanethiol 투여가 간기능에 미치는 영향

윤종국[†] · 정소용^{*} · 차상은^{**}

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

*대구보건전문대학 임상병리과

**안동전문대학 산업위생과

An Effect of Methanethiol Treatment on the Liver Function of Rats Previously Fed Low or High Protein Diet

Chong-Guk Yoon[†], So-Woong Jeong^{*} and Sang-Eun Cha^{**}

Dept. of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

*Dept. of Medical Technology, Daegu Health Junior College, Daegu 702-260, Korea

**Dept. of Industrial Hygiene, Andong Junior College, Andong 762-820, Korea

Abstract

To evaluate an effect of dietary protein on the intoxication of methanethiol in rats, the methanethiol was intraperitoneally injected to the rats fed a low or high protein diet and then the liver weight per body weight and serum levels of alanine aminotransferase (ALT) activities were determined to investigate the differences in liver damage between the animal groups fed low protein diet and that fed high protein diet. On the other hand, the hepatic glutathione content and its conjugating enzyme, glutathione S-transferase (GST) activity were determined to clarify the cause of difference in liver function between the two groups. The increasing rate of liver weight/body wt., serum levels of ALT to its control group were higher in methanethiol-treated rats fed low protein diet than those fed high protein diet. The hepatic content of glutathione and GST activity were higher in rats fed high protein diet than those fed low protein diet and the decreasing rate of hepatic glutathione content to its control group was higher in rats fed low protein diet than those fed high protein diet. Furthermore, the hepatic GST activity in methanethiol-treated rats was higher in rats fed high protein diet than those fed low protein diet. In case of control group, the GST activity was also higher in rats fed high protein diet than those fed low protein diet.

Key words : high protein diet, low protein diet, glutathione, glutathione-S-transferase, methanethiol

서 론

최근 산업발전에 따른 산업 공해물질에 대한 독성예방대책이 강구되고 있으며, 이에 대한 방안의 일환으로서 영양 관리적 측면에서도 관심을 갖고 있는 실정이다. 이를 유해산업공해물질 중 methanethiol은 산업체의 생산공정에서 부산되는 외인성 공해물질일 뿐만 아니라¹⁾ methionine 과량 섭취시 이물질의 대사과정에서 생성되기도 하며²⁾, 소장에서 혼기성 세균에 의하여

미흡수 잔존식이성 단백질로부터 유래된 H₂S가 소장 점막에서 alkylation되므로서 생성되는 내인성 독성물질로도 알려져 있다^{3,4)}.

Methanethiol은 간성 뇌질환⁵⁾ 뿐만아니라 생체내에서 생체막의 손상을 유도한다고 하며⁶⁾, 최근 본 연구자들⁷⁾은 methanethiol이 간손상을 유도함을 관찰한 바 있다.

한편 산업공해물질인 xenobiotics와 생체의 단백영양 상태와의 상호작용은 오래전부터 연구의 대상이 되어 왔다⁸⁻¹¹⁾. 그러나 외인성 독성물질로서의 xenobiotics의 일종인 methanethiol과 단백영양조건과의 상호작용에

[†]To whom all correspondence should be addressed

관한 보고는 접한 바 없다.

이에 본 연구에서는 methanethiol이 단백식이 조건에 따른 간기능에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 실험동물에 methanethiol을 투여한 다음, 체중당 간무게, 혈청 alanine aminotransferase(ALT)와 ALT(생략함)을 측정하여 식이성단백질에 따른 간기능 정도를 관찰하는 한편 이에 대한 기전을 규명하는 일환으로 methanethiol과 같은 독성물질해독에 관여하는 간 glutathione 함량과 이에 포함효소인 glutathione S-transferase^[12](이하 GST라 생략함)활성을 측정하여 이들 성적을 비교 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 처치

실험동물은 체중이 125g 내외되는 외견상 건강한 SD계 숫 흰쥐를 Table 1에 표시된 사료성분표의 식이로 저단백식이군(LP; 7% casein)과 고단백식이군(HP; 20% casein)으로 구분하여 약 1개월간 사육하였다. 고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육시킨 HP군 및 LP군 각 6마리에 methanethiol (methyl mercaptan sodium salt; 日本 東京化學)을 생리식염수에 용해시

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 B12 ^{d)}	1	1
Salt mixture ^{e)}	40	40
α -Cellulose	20	20

*4190.90Kcal

^{a)}Vitamin A & D mixture : 51,000unit of A and 5,100unit 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, niacinic 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

킨 7.5% 용액을 체중 100g당 0.1ml를 4시간 간격으로 2회 복강내에 주사하였으며 대조군은 saline만 투여한 다음 4시간 후 경도의 ether마취하에 복부대동맥으로부터 실혈사시켰으며, 같은 생리식염수로 관류하여 간 조직 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하여 그 중량을 침량하였다.

간 조직 효소액의 조제

조직은 4°C 하에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 침량하여 4배량의 냉동 0.25M sucrose를 첨가하여 teflon glass homogenizer로 마쇄하여 간균질액 (20%w/v)을 만들었다. 이 간 균질액을 4°C에서 700×g로 10분간 원침시켜 핵 및 미마쇄분을 제거한 다음 그 상층액을 15,000×g에서 20분간 원침하여 상층액을 효소활성 및 단백질정량에 사용하였다.

혈청 ALT 활성측정

혈청 ALT 활성측정은 Reitman과 Frankel의 방법^[13]에 의해 측정하였으며, 효소활성단위는 혈청 1ml당 Karnmen unit^[14]로 표시하였다.

간조직의 glutathione 함량측정

간조직 일정량을 생리식염수 9배량을 가하고 glass teflon homogenizer로 마쇄하여 간균질액 10%w/v를 만든 다음 이것을 glutathione 함량측정에 사용하였다.

Glutathione의 함량은 Ellman의 방법^[15]에 준하여 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 파장 412nm에서 측정하였다.

간조직 glutathione S-transferase의 활성측정

Glutathione S-transferase의 활성측정은 Habig 등^[16]의 방법에 준해 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 1mM, glutathione 1mM 및 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 일정량의 효소액을 함유시킨 반응액을 25°C에서 10분간 반응시켜 생성된 glutathione-2,4-dinitrobenzene conjugate를 파장 340nm에서 측정하였다. 효소의 활성단위는 단백 1mg에 의하여 1분 동안에 생성된 conjugate의 양을 nmoles로 나타내었다.

간 조직의 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등^[17]의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로하여 측정하였다. 얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우에는 student t-검정법에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

성장기간동안 체중의 변동

실험동물을 casein으로 단백함량을 달리하여 성장시켰을 때 HP군의 성장율이 LP군 보다 약 50% 증가되었다 (Fig. 1). 이는 본 연구자들의 이전 보고¹⁸⁻²⁰⁾와 유사하였다.

그러므로 본 실험조건이 저단백 및 고단백식이 조건의 실험동물모델로 확인되었다.

체중당 간중량 및 혈청 ALT활성변동

체중당 간 중량에 있어서 LP군은 methanethiol 투여군이 대조군 보다 약 14%증가되는 경향을 보였으나, HP군은 대조군과 실험군 간에 별다른 차이를 볼 수 없었다(Table 2 참조).

간손상시 그 활성이 증가된다는 혈청 ALT 활성^{21,22)}은

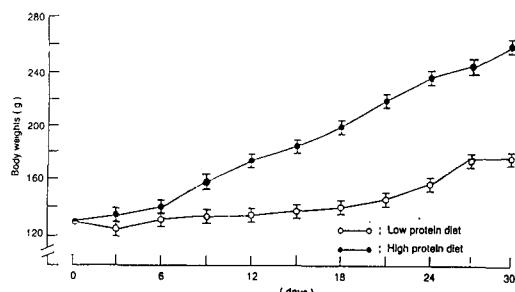


Fig. 1. One month weight gain in rats fed a low or high protein diet.

Each value is the mean \pm S.E. of 12 rats

Table 2. Effect of methanethiol administration on the changes of liver weight per body weight in rats fed a low or high protein diet

Groups	% Liver wt./body wt.	
	Control	Methanethiol treatment
High protein diet	3.20 \pm 0.10	3.13 \pm 0.12
Low protein diet	2.64 \pm 0.11*	3.00 \pm 0.10

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats

* Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

Table 3. Effect of methanethiol administration on the changes of alanine aminotransferase activities in rats fed a low or high protein diet

Groups	Levels of ALT activity	
	Control	Methanethiol treatment
High protein diet	27.30 \pm 2.34	79.06 \pm 5.97***
Low protein diet	31.67 \pm 3.18	155.97 \pm 24.54***

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats

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

LP군에서는 methanethiol 투여군이 대조군에 비하여 약 5배의 현저한 증가를 보였으며, HP군에서는 methanethiol 투여군이 대조군 보다 약 5배의 현저한 증가를 나타내었다(Table 3 참조).

따라서 methanethiol 투여로 인한 간무게 및 혈청 ALT활성 증가율이 HP군 보다 LP군이 높게 나타남을 알 수 있었다.

이같이 methanethiol 투여가 간기능이 저하된 성적은 정 등⁷⁾의 보고와 일치하였다. Methanethiol이 간손상을 유도함은 methanethiol이 생체막의 항산화에 관여하는 어떤 효소활성의 억제에 기인된다는 보고⁶⁾와 methanethiol에 의한 간기능은 내인성 독성물질의 해독에 관여하는 간 조직 glutathione 함량과 이의 포함효소인 GST 활성이 억제되므로 나타난다는 점^{7,12)}을 감안해 볼 때, 실험동물의 식이성 단백함량에 의한 생리활성 물질의 함량차이로 단백식이 조건에 따른 methanethiol에 의한 간기능에 차이가 나타날 것으로 생각된다.

간조직 중 glutathione 함량 및 GST활성 변동

실험동물에 methanethiol을 투여한 후 간조직 중 glutathione 함량을 관찰한 성적은 Table 4와 같으며 간 GST 활성을 나타낸 성적은 Table 5와 같다.

Table 4. Effect of methanethiol administration on the hepatic glutathione levels in rats fed a low or high protein diet

Groups	Hepatic glutathione contents (μ moles/g wt. liver)	
	Control	Methanethiol treatment
High protein diet	4.95 \pm 0.36	4.43 \pm 0.34
Low protein diet	3.40 \pm 0.11**	3.02 \pm 0.09*

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats

* Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from the control group fed a high protein diet ($p < 0.01$)

Table 5. Effect of methanethiol administration on the hepatic glutathione S-transferase activities in rats fed a low or high protein diet

Groups	Hepatic glutathione S-transferase activities (nmoles/mg protein/min)	
	Control	Methanethiol treatment
High protein diet	730 \pm 31.80	813.23 \pm 25.76
Low protein diet	510 \pm 31.26*** ^a	767.76 \pm 27.97*** ^b

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats

***^a Significantly different from the rats fed high protein diet ($p < 0.01$)

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

Saline만 투여한 대조군에 있어서 간 glutathione 함량은 LP군이 HP군 보다 약 31%의 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며, methanethiol을 투여한 실험군에서도 LP군이 HP군 보다 감소되었다.

특히 간 glutathione 함량은 LP군에서 methanethiol 투여군이 대조군 보다 유의하게 ($p < 0.05$) 감소되었다. 한편 saline만 투여한 대조군에서 GST 활성을 역시 LP군이 HP군 보다 약 30% 유의하여 ($p < 0.001$) 저하되었다.

따라서 GST 효소와 간 glutathione이 methanethiol 해독에 관여한다는 사실^{7,12}과 본 실험성적을 종합하여 볼 때 식이성 단백질 함량이 methanethiol 해독에 영향을 미침을 시사해 주고 있다.

요 약

식이성 단백이 methanethiol에 의한 간기능에 어떤 영향을 미치는지를 검토코자 흰쥐를 저단백식이 (LP ; casein 7%) 및 고단백식이 (HP ; casein 20%)로 1개월간 성장시킨 뒤 methanethiol을 투여한 다음, 간무게, 혈청 ALT 활성을 측정하여 간기능 정도를 두 군간에 비교하였다. 동시에 이에 대한 원인을 규명하는 일환으로 간 조직 중 glutathione 함량과 glutathione 포합효소의 일종인 glutathione S-transferase (GST) 활성을 측정하여 다음과 같은 실험결과를 얻었다. Methanethiol 투여로 인한 대조군에 대한 간무게와 혈청 ALT 활성을 증가율은 LP군이 HP군보다 높았으며, 간 glutathione 함량과 간 GST 활성이 HP군 보다 LP군이 낮게 나타났다. 이상 성적을 종합해 볼 때 methanethiol에 의한 간 독성은 식이 중 단백질 함량 감소에 비례해서 증가되며 이는 LP군이 HP군 보다 methanethiol 해독에 관여하는 간 glutathione 함량과 GST 활성의 감소에 기인되기 때문인 것으로 생각된다.

문 헌

- Rose, V. E. : Thiols. In "Encyclopaedia of occupational health and safety" Parmeggiani, L.(ed.), International Labour Office Geneva, Vol. 2, p.2172(1983)
- Blom, H. J., Jacintha, P. A. M., Yap, S. H. and Tangerman, A. : Methanethiol and dimethylsulfide formation from 3-methylthio-propionate in human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **972**, 131(1988)
- Kirk, E. : The quantity and composition of human colonic flatus. *Gastroentrol.*, **12**, 782(1949)
- Sogaard, H. : Hydrogen sulfide producing variants of *Escherichia coli*. *Acta Vet. Scand.*, **16**, 13(1975)
- Zieve, L., Doizaki, W. M. and Zieve, F. J. : Synergism between the mercaptans and ammonia or fatty acids

in the production of coma. : A possible role for mercaptans in the pathogenesis of hepatic coma. *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 16(1974)

- Finkelstein, A. and Benevenga, N. J. : The effect of methanethiol and methionine toxicity on the activities of cytochrome C oxidase and enzymes involved in protection from peroxidative damage. *J. Nutr.*, **116**, 204(1986)
- 정소옹, 윤종국 : 흰쥐에 methanethiol 투여가 간 기능에 미치는 영향. 연구논집(제명대학교 기초과학 연구소), **9**(2), 119(1990)
- 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 and Toxicology*, **29**, 180(1947)
- Weatherholz, W. M., Campbell, T. C. and Webb, R. E. : Effect of dietary protein levels on the toxicity and metabolism of heptachlor. *J. Nutr.*, **98**, 90(1969)
- Campbell, T. C. and Hayes, J. R. : Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme system. *Pharmacol. Rev.*, **26**(3), 171(1974)
- Drill, V. A. : Hepatotoxic agents. : Mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**, 1(1952)
- Mannervik, B. : Thiol transferases. In "Enzymatic basis of detoxication". Academic press, Vol. II, p.229(1980)
- Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56(1957)
- Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, J. S. : Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.*, **34**, 126(1955)
- Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70(1959)
- 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)
- 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)
- 윤종국, 이상일, 신중규 : 식이성 단백질 함량에 따른 흰쥐에 사염화탄소 투여가 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **20**(6), 527(1991)
- 윤종국 : 단백식이 조건을 달리 하여 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여가 purine체 대사효소 활성에 미치는 영향. 대한보건협회지, **17**(1), 21(1991)
- 윤종국 : 저단백식이로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여시 소장과 간 조직 중 xanthine oxidase 활성비교. 대한보건협회지, **18**(1), 183(1992)
- Wroblewski, F. and LaDue, J. S. : Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 569(1959)
- Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inove, H. : The biochemistry of animal cells, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cell. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3590(1964)

(1992년 10월 8일 접수)