

Alcohol 섭취 쥐에서 Alcohol 대사효소계에 미치는 복어추출물의 효과

김동훈 · 김동수* · 최종원†

경성대학교 약학과

*경성대학교 식품공학과

Effect of Puffer Fish Extract on the Hepatic Alcohol Metabolizing Enzyme System in Alcohol-Treated Rat

Dong-Hoon Kim, Dong-Soo Kim* and Jong-Won Choi†

Dept. of Pharmacy, Kyungshung University, Pusan 608 - 736, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Kyungshung University, Pusan 608 - 736, Korea

Abstract

The present study was undertaken to clarify the effect of Puffer fish skin extract (PF) on the hepatic alcohol metabolism in rats. It was observed that alcohol concentration in blood had been markedly decreased by the pretreatment of PF for two weeks. Activities of alcohol dehydrogenase (ADH) and microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) were significantly increased (more than 20% of control) by pretreatment of PF for two weeks and acute alcohol intoxication (5g/kg) on final day. When rats were fed with subacute toxic state by alcohol (25v/v%, once a day for six weeks), activities of ADH and MEOS were significantly increased by additional treatments of PF for final two weeks. But the catalase activity was not affected by any of both case. And also activities of ADH and MEOS *in vitro* were not changed. These results suggest that PF treatment prompted the recovery from alcohol intoxication.

Key words : puffer fish, alcohol dehydrogenase, microsomal ethanol-oxidizing system, catalase, alcohol-intoxication

서 론

섭취된 alcohol은 문맥을 거쳐 간으로 운반되어지고 간에서 acetaldehyde를 거쳐 최종적으로 물과 탄산가스로 분해된다^{1,2}. Alcohol의 일차적인 산화반응에는 3가지의 효소계가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다^{3,4}. Alcohol의 혈중농도는 alcohol의 산화속도와 밀접한 관계를 가지고 있으며 이러한 혈중농도는 alcohol의 약리작용을 조절하는 중요한 인자로 보고되고 있다⁵. 우리나라에서는 오래전 부터 음주후에 복어를 재료로하는 음식을 즐겨 먹는 식습관이 있으나 현재까지 그 해독작용에 대하여서는 검토되고 있지 않는 실정이다. 한편, 복어독 성분으로 알려져 있는 tetrodotoxin은 신경마비성 독작용 이외에 활동 전위를 발생하는 흥분막(excita-

ble membrane)에 있어서 Na⁺-channel blocker로서 Na⁺의 출입을 조절함으로써 생체내 대사에 관련된 정보의 전달과 근육 수축 및 이완 등 다양한 생리활성 기능을 가지고 있다^{6,7}. 본 연구에서는 복어 성분이 alcohol의 대사에 어떠한 영향을 미치는가를 연구하는 과정에서 alcohol의 1차 산화반응을 촉매하는 효소들의 활성에 복어 추출물이 어떠한 영향을 주는가를 alcohol을 섭취케한 실험동물에서 alcohol의 혈중농도와 상호 비교 관찰함으로써 alcohol의 해독 기구에 관여하는 복어의 작용기전을 추구하고자 하였다.

재료 및 방법

복어 성분 분석의 추출

시중에서 구입한 가치복(*Fuga xanthropterus*)의 껍질을 음건한 다음 마쇄하고 Hashimoto 등의 방법⁸에 준

† To whom all correspondence should be addressed

해 70% methanol에 가열하면서 3회 추출, 여과 및 감압 농축하고 ether을 첨가하여 지용성 부분을 제거한 수용성 분획(이하 복어추출물이라 칭함)을 시료 1g당 280mg을 얻고 실험에 사용하였다.

동물의 처치

동물은 한국 실험동물개발로부터 분양받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도: $20 \pm 2^\circ \text{C}$, 습도: 40~60%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 2주동안 적응시킨 체중 150g내외의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다.

복어추출물은 생리식염수에 용해시킨 다음 체중 kg당 100mg을 1일 1회 구강으로 2주간 투여하였으며, 급성 alcohol중독은 Kato 등의 방법¹⁰⁾에 준해 5g/kg(30% wt/vol)을 도살 90분전에 복강내로 주사하였고, 아급성 alcohol중독군은 Liu 등의 방법¹⁰⁾에 따라 25% alcohol 용액을 물대신 임의로 6주간 섭취시켰으며 마지막 2주간은 복어추출물을 투여하였다. 대조군은 alcohol과 동일 열량의 sucrose용액 및 시료 투여시는 생리식염수로 조절하였으며, 실험동물은 처치전 24시간 절식시킨 후 사용하였다.

효소원의 조제

실험동물을 CO₂ gas로 가볍게 마취시킨 후 복부정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥으로부터 혈액을 취하고, 생리식염수로 씻은 다음 여지로 압박하여 간에 남아있는 혈액 및 생리식염수를 제거한 후, 간조직 1g당 2mM mercaptoethanol이 함유된 4배량의 0.25M sucrose buffer를 가하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분, 10,000×g에서 20분 및 105,000×g에서 1시간동안 초원심분리하여 mitochondria분획 및 microsome분획을 얻었다.

Mitochondria분획은 alcohol dehydrogenase 및 catalase활성 측정의 효소원으로, microsomal 분획은 microsomal ethanol-oxidizing system활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C 이하에서 행하였으며, 채취한 혈액은 alcohol 농도의 측정에 사용하였다.

효소활성 측정

Alcohol dehydrogenase (ADH)의 활성은 Bosron 등의 방법¹¹⁾을 약간 변경하여, 0.05M glycin/NaOH buffer중에 기질로서 10mM ethanol, 조효소로서 13.3mM NAD 및 효소액 0.1ml를 가하여 최종 반응액이 4ml로 하여

37°C에서 5분간 반응시킨 후 생성되는 NADH를 340nm에서 흡광도를 읽고, 검량선에 준해 단백질 1mg이 1분간 반응하여 생성되는 NADH량을 nmole로 표시하였다.

Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS)의 활성은 Lieber와 DeCarli의 방법¹²⁾에 따라 50ml의 Erlenmeyer flask형 반응용기의 out well에 반응액 ml당 0.3μM NADPH, 50μM ethanol, 5μM MgCl₂, 80μM phosphate buffer (pH 7.4)와 microsomal 분획 1ml를 첨가하고 center well에는 0.16M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 0.015M semicarbazide HCl 함유) 0.6ml를 넣고 30분간 37°C에서 반응시킨 다음 70% TCA를 out well에 넣어 반응을 종료시키고 실온에서 24시간 방치시킨 후 생성되는 acetaldehyde-semicarbazone의 흡광도를 224nm에서 읽음으로서 MEOS의 활성을 측정하고 검량선에 의하여 그 흡광도를 산정하여 1분간에 1mg 단백질이 생성하는 acetaldehyde nmole로 표시하였다. Catalase활성은 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 중에 기질인 10mM H₂O₂의 환원되는 정도를 파장 240nm에서 그 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하는 Aebi의 방법¹³⁾에 준하였다. 효소의 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분동안 반응하여 분해되는 H₂O₂양을 μmole로 표시하였다.

혈중 alcohol 농도 측정

Penton의 방법¹⁴⁾을 약간 변경하여 gas-chromatography (Shimadzu GC-RIA)로서 분석하였으며 기기분석 조건은 column: 15% PEGS chromosorb WAW, 15×0.53mm, FID detector temp. 150°C, flow rate (carrier gas) 50ml/min (N₂), column temp. 130°C이었다.

단백질 정량

Lowry 등의 방법¹⁵⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

통계처리

실험군당 평균치와 표준오차를 계산하였고 5% 수준에서 Duncan's multiple test 및 student's t-test로 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

복어추출물이 alcohol의 혈중농도에 미치는 영향

복어추출물을 2주간 전처리한 실험동물에 alcohol을 복강내에 주사한 급성중독군과 25% alcohol을 6주간 섭취케 하고서 복어추출물을 투여한 군에서 alcohol의 혈중 농도를 비교 관찰한 성적이 Table 1이다. 급성 alcohol실험군에서의 혈중농도가 복어추출물을 전처리 하므로써 약 47%의 현저한 감소를 보였다. 한편, alcohol을 임의로 섭취한 아급성 alcohol실험군에서는 혈중농도가 복어추출물을 처리하므로써 약 33%로 감소 되었다. 이로보아 복어의 추출물속에는 alcohol의 혈중 농도를 감소 시키는 물질이 함유되어 있을 것으로 생각되어 아래의 실험을 행하였다.

생체내에서 ADH의 활성에 미치는 영향

Alcohol용액을 투여하고 간 ADH의 활성에 복어추출물이 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 성적이 Fig. 1이다. 대조군의 활성도가 13.6±1.1 NADH nmole/mg protein/min인데 비해 alcohol 급성투여군에서는 19.9±1.2 NADH nmole/mg protein/min로 약 46%정도 효소의 활성이 증가 되었으며, 복어추출물을 전처리하고 alcohol을 투여한 실험군에서는 alcohol 단독 투여군보다 약 25%의 증가를 보였다. 한편 아급성 alcohol중독군에서는 본 효소의 활성이 대조군 보다 약 27% 증가되었고 alcohol을 섭취한군에 복어추출물을 처리한 군에서는 ADH의 활성이 21.41±0.1 NADH nmole/mg protein/min로써 복어추출물을 투여하지 않는 군보다 약 21% 정도 증가되었다.

Table 1. Effect of Puffer fish skin extract on the blood alcohol concentration in rat after alcohol treatment

	Treatment	Concentration (mg/dl)	Percentage
Acute	Alcohol	131.3±6.49 ^a	100
	PF + Alcohol	70.0±6.05 ^b	53
Subacute	Alcohol	133.8±9.72 ^a	100
	Alcohol + PF	88.7±5.18 ^c	67

Acute treatment : 5g/kg (30% wt/vol) of alcohol solution was injected intraperitoneally after Puffer fish skin extract (PF, 100 mg/kg) p.o. treatment for 2 weeks. Subacute treatment : male rats given 25% (v/v) alcohol solution for 6 weeks and PF p.o. treatment for final two weeks. The animals were decapitated 180 min after administration of last dose of alcohol. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for 6 animals. Values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

간 세포에서 alcohol의 대사는 alcohol을 acetadehyde로 전환시키는 반응에서 시작¹⁹⁾되며 alcohol 급성중독시 ADH가 alcohol의 대사에 관여한다는 보고^{17,18)}와 본 실험에서 아급성중독군보다 급성중독군에서 ADH의 활성이 현저히 증가된 점을 고려해 볼 때 이러한 결과는 주 등¹⁹⁾ 및 최 등²⁰⁾이 보고한 ethanol의 아급성 중독상태의 rat에서 ADH의 활성이 증가된다는 보고와 유사하였다. 이로보아 복어추출물은 급성적으로 alcohol을 섭취하는 경우 간에서 ADH의 활성을 조절하여 alcohol의 대사계를 더욱 활성화시킬 것으로 사료된다.

생체내에서 MEOS의 활성에 미치는 영향

실험동물에 alcohol을 투여하고 간 MEOS의 활성에 복어추출물이 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 결과가 Fig. 2로서 급성중독 상태를 야기시켰을 때 MEOS의 활성도가 7.3±0.40 acetaldehyde nmole/mg protein/min로써 대조군의 5.2±0.25 acetaldehyde nmole/mg protein/min보다 다소 활성이 증가되었으며, 복어추출물을 전처리하고 alcohol을 투여하였을 때에는 alcohol 단독투여군에 비하여 약 26%의 증가를 보였다. 25% alcohol용액을 6주간 섭취케한 아급성중독군에서는 대조군에 비해 본 효소의 활성도가 10.1±0.19 acetal-

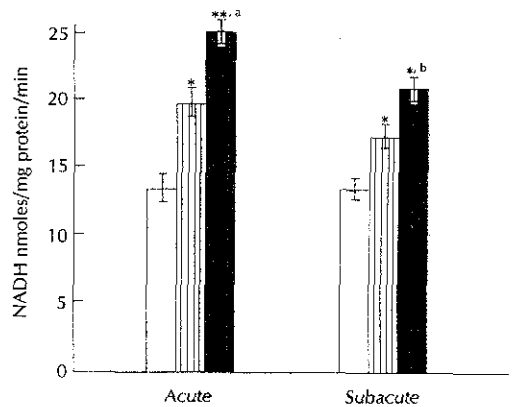


Fig. 1. Effect of Puffer fish skin extract on the hepatic cytosolic alcohol dehydrogenase activity in acute and subacute alcohol treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. The assay procedure was described in the experimental methods. The other conditions were described the same as in the Table 1.

□ ; Control ▤ ; Alcohol ■ ; PF + Alcohol
 *Significantly different from the control (*p<0.05, **p<0.01)
^aSignificantly different from the alcohol (^ap<0.05).

dehyde nmole/mg protein/min로 약 91%의 현저한 증가를 볼 수 있었으며, 만성 alcohol 섭취군에 복어추출물을 투여한 군은 16.4 ± 0.30 acetaldehyde nmole/mg protein/min로서 alcohol 섭취군보다 약 63%의 효소 활성이 증가됨을 관찰하였다.

또 다른 alcohol의 대사계²⁰⁾인 MEOS의 경우 급성 alcohol중독군 보다는 아급성으로 alcohol을 섭취한 군에서 효소의 활성이 약 1.8배 정도 증가됨을 관찰할 수 있어 alcohol을 만성적으로 투여할 때 MEOS의 활성이

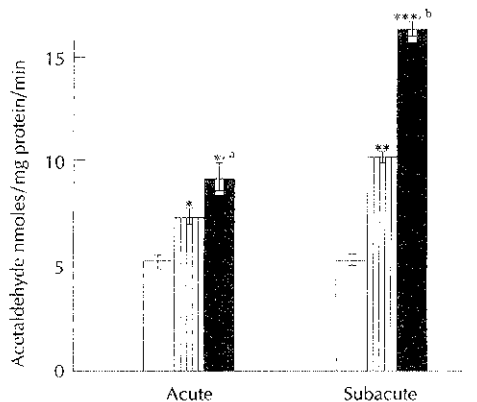


Fig. 2. Effect of Puffer fish skin extract on the hepatic microsomal ethanol-oxidizing system activity in acute and subacute alcohol treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. The other conditions were described the same as in the Table 1.

□; Control ▤; Alcohol ■; PF + Alcohol

Significantly different from the control(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Significantly different from the alcohol(* $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$).

Table 2. Effect of Puffer fish skin extract on the hepatic catalase activity in acute and subacute alcohol-treated male rats

Treatment	Activity		% of control
	H ₂ O ₂ decreased μ moles /mg protein/min		
Acute	Control	2.93 \pm 0.21 ^{NS,1,2)}	100
	Alcohol	3.13 \pm 0.17	106
	PF + Alcohol	3.19 \pm 0.22	108
Subacute	Control	2.96 \pm 0.19	100
	Alcohol	3.16 \pm 0.18	107
	Alcohol + PF	3.28 \pm 0.21	110

¹⁾ Mean \pm S.D. (n=6)

²⁾ NS; not significant

For experimental details : see materials and methods.

ADH보다 alcohol의 산화반응이 alcohol의 대사과정에 중요한 역할^{22,23)}을 담당하고 있을 것으로 생각되어지고 있다. 한편 alcohol용액을 장기간 섭취케한 실험동물에 복어추출물을 투여하였을 때 MEOS의 활성이 alcohol 단독 투여군보다 더욱 증가되는 점으로 보아 복어는 만성 alcohol 중독상태에서 alcohol의 산화를 빠르게 하여줌으로서 alcohol이 생체내에 미치는 작용을 감소시킬 것으로 예상된다.

체내에서 catalase의 활성에 미치는 영향

Alcohol 용액을 투여하고 간 mitochondria 분획 catalase 활성에 미치는 복어추출물의 영향을 관찰한 성적이 Table 2로서 alcohol의 급성중독군에서나 아급성중독군에서 모두 대조군에 비해 별다른 영향이 없었으며, 복어추출물을 투여한 실험군에서도 catalase의 활성에는 별다른 영향이 없었다. 생체내에서 alcohol이 대사될 때 catalase가 관여하는 산화반응에는 큰 의의가 없을 것이라는 보문^{24,25)}과 연관시켜 볼 때 복어추출물은 생체내에서 alcohol의 산화반응을 실질적으로 촉매하는 효소라고 생각되는 ADH와 MEOS에 선택적으로 작용하여 그 활성을 유도함으로써 간에서 alcohol의 대사를 촉진시킬 것으로 생각되어진다.

시험관내에서 alcohol의 산화효소계에 미치는 복어추출물의 영향

Alcohol에 의해 유도된 ADH 및 MEOS의 활성이 복어추출물의 처리로 효소의 활성이 증가되는 현상이 복어추출물의 직접적인 작용에 의해 나타나는 것인지를 검토할 목적으로 ADH와 MEOS의 측정용 반응액중에 복어추출물의 첨가 농도를 증가시켜 가면서 ADH 및 MEOS의 활성을 관찰한 성적이 Fig. 3이다. 복어추출물을 10 μ g/ml까지 반응액중에 첨가하여도 간조직중 ADH 및 MEOS의 활성은 대조치와 아무런 효소의 활성 변동은 관찰되지 않았다. 이러한 실험 결과로 보아 복어추출물의 투여에 의한 alcohol 산화효소계의 활성 증가현상은 복어추출물이 효소의 활성에 직접적인 영향을 줌으로서 나타나는 것은 아닌 것으로 추측된다.

이상의 실험성적을 종합하여 볼 때, 급성 및 만성 alcohol 중독상태에서 복어추출물이 ADH 및 MEOS의 활성을 증가시키는 작용은 alcohol의 대사를 촉진시켜 alcohol의 혈중 농도를 감소시키고 또한 생체와의 작용시간을 단축시킬 것이며 alcohol의 유해작용을 방어하는 수단으로 기여할 것으로 생각되어진다.

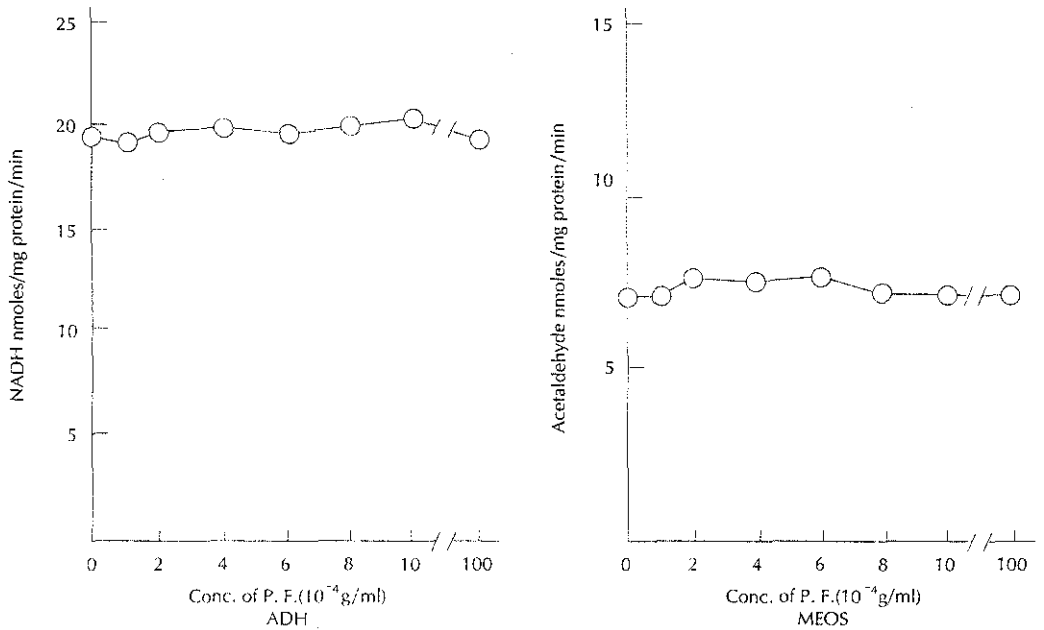


Fig. 3. Changes on the hepatic alcohol metabolism enzyme system in various concentration of Puffer fish skin extract in acute alcohol-treated rats *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 4 separate experiments.

요 약

복어추출물이 alcohol 해독과정에 어떤 영향을 주는가를 관찰할 목적으로 실험동물에 전 처리한 다음 alcohol의 산화 효소계에 미치는 영향을 검토하였다. 복어추출물(100mg/kg)을 6주간 실험동물에 투여하고 급성 및 아급성 alcohol 중독을 야기시킨 군에서 혈중 alcohol 농도를 측정하였을 때 복어추출물의 투여로 alcohol 단독투여군 보다 현저히 감소되었다. 한편, alcohol dehydrogenase (ADH) 및 microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS)의 활성은 alcohol 투여로 증가되던 효소의 활성이 복어추출물의 전처리로 두 효소의 활성의 차이는 있으나 alcohol의 단독투여군 보다 현저히 활성이 증가되었다. 반면에 catalase의 활성은 본 실험 조건에서는 별다른 영향이 없었다. 시험관내에서 복어추출물의 첨가 농도를 증가시켜 가면서 alcohol로 유도된 간 조직중 ADH 및 MEOS의 활성을 측정하였을 때 효소 활성의 변동은 관찰되지 않았다. 이상의 실험 결과, 복어추출물은 alcohol의 산화 효소계를 조절함으로써 급, 아급성 alcohol 중독의 해독에 사용될 수 있는 가능성을 시사한 것으로 사료된다.

문 헌

- Larsen, J. A. : Extrahepatic metabolism of ethanol in man. *Nature*, **184**, 1236 (1959)
- Lundquist, F. : The metabolism of alcohol. In "Biological basis of alcoholism" Israel, Y. and Mardones, T. (eds.), John Wiley, New York, p.1 (1971)
- Lundquist, F. : Interference of ethanol in cellular metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **252**, 11 (1975)
- Koop, D. R., Morgan, E. T., Tarr, G. E. and Coon, M. J. : Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome p-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8472 (1982)
- Lieber, C. S., Barasona, E., Hernandez, R., Kubota, S., Sato, N., Kawano, S., Matsumura, T. and Inatomi, N. : Impaired oxygen utilization, a new metabolism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. *J. Clin. Invest.*, **83**, 1682 (1984)
- Saito, T., Noguchi, T., Harada, T., Murata, O. and Hashimoto, K. : Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1175 (1985)
- Kodama, M., Sato, S., Ogata, T., Suzuki, Y., Kaneco, T. and Aida, K. : Tetrodotoxin secreting glands in the skin of puffer fishes. *Toxicol.*, **24**, 819 (1986)
- Hashimoto, Y., Yasumoto, T., Kamiya, H. and Yoshida, T. : Occurrence of ciguatoxin and ciguaterin in

- ciguatoxic fishes in the Ryukyu and Amami island. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher.*, **35**, 327 (1969)
9. Kato, S., Kawase, T., Alderman, J., Inatomi, N. and Lieber, C. S. : Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterol.*, **98**, 203 (1990)
 10. Liu, S. J., Ramsey, R. K. and Fallon, H. J. : Effects of ethanol on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 369 (1975)
 11. Bosron, W. F., Li, T. K., Lange, L. G., Dalfeldecker, W. P. and Vallee, B. L. : Isolation and characterization of an anodic form of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 85 (1977)
 12. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : Ethanol oxidation by hepatic microsomes : Adaptive increase after ethanol feeding. *Science*, **162**, 917 (1968)
 13. Aebi, H. : Catalase. In "Methods of enzymatic analysis" Bergmeyer, H. U.(ed.), Academic Press, New York, Vol. 2, p.673 (1974)
 14. Penton, Z. : Gas-chromatographic determination of ethanol in blood with 0.53-mm fused-silica open tubular columns. *Clin. Chem.*, **33**, 2094 (1987)
 15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 16. Steinmetz, P. R. : Liver adaptation and injury in alcoholism. *New Engl. J. Med.*, **288**, 356 (1973)
 17. Koivula, T. and Lindors, K. O. : Effect of long-term ethanol treatment on aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1937 (1975)
 18. Burnett, K. G. and Feider, M. R. : Ethanol metabolism in peromyscus genetically deficient in alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1 (1980)
 19. 주중노, 구자현, 강방희 : 인삼사포닌의 생화학적 연구(XIV) ; 인삼사포닌이 알코올 산화에 미치는 영향. *한국생화학회지*, **12**, 18 (1979)
 20. 최종원, 이상일, 허근 : 단성 alcohol섭취 mouse에서 alcohol대사 효소활성에 미치는 인삼의 영향. *대한약리학회지*, **20**, 13 (1984)
 21. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system(MEOS) for ethanol metabolism *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**, 279 (1972)
 22. Mezey, E. and Tobon, F. : Rates of ethanol clearance and activities of the ethanol oxidizing enzyme in chronic alcoholic patients. *Gastroenterol.*, **61**, 707 (1971)
 23. Ishii, H., Tory, T. G. and Lieber, C. S. : Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 411 (1973)
 24. Orne-Johnson, W. H. and Ziegler, D. : Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 78 (1965)
 25. Lieber, C. S. : Medical disorders of alcoholism. In "Pathogenesis and treatment" Lieber, C. S.(ed.), WB Saunders Company, Philadelphia, p.526 (1982)

(1994년 1월 28일 접수)