

흰쥐에서 Acetaldehyde대사에 미치는 복어추출물의 영향

김동훈 · 김동수* · 최종원†

경성대학교 약학과

*경성대학교 식품공학과

The Effect of Puffer Fish Extract on the Acetaldehyde Metabolism in Rat

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

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

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

Abstract

The present study was undertaken to investigate the possible effect of Puffer fish skin extract (PF) on the hepatic acetaldehyde metabolism. It was observed that PF markedly decreased the acetaldehyde levels in blood and liver. The activity of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (Ald DH) increased by induction of acute intoxication of alcohol (5g/kg) was further increased through pretreatment with PF for 2 weeks. When PF was given to rat fed with 25% alcohol solution instead of water for 6 weeks, the activity of Ald DH in mitochondrial fraction decreased to about 28% compared with sucrose-treated group. But after pretreatment of PF, the activity was restored to the normal level. By the treatment with disulfiram (300mg/kg, once a day for 3 days) the mitochondrial Ald DH activity was inhibited in control and alcohol-treated group. However, the activity was restored to the control after the pretreatment with PF. And also mitochondrial Ald DH activity *in vitro* was not changed. All these observations suggest that reduction of acetaldehyde levels are partly due to increase activity of mitochondrial Ald DH. Therefore, the recovery from intoxication of acetaldehyde may be enhanced by treatment with PF.

Key words : puffer fish, aldehyde dehydrogenase, acetaldehyde concentration, alcohol intoxication

서 론

Alcohol의 섭취시 나타나는 독성은 alcohol 자체에 의한 것과 이의 대사물인 acetaldehyde에 의한 복합적인 작용으로 알려져 있으며¹⁾, 이 중 acetaldehyde는 생체에 독성이 강력하여 alcohol중독의 원인 물질로 보고되어지고 있다²⁻⁴⁾. 특히 만성적으로 alcohol을 섭취할 때 acetaldehyde를 산화시키는 mitochondrial aldehyde dehydrogenase (Ald DH)의 활성이 억제⁵⁾되어 체내에 acetaldehyde가 축적되어지므로써 생체는 심한 손상을 받는 것으로 알려져있다^{6,7)}. 한편 민간에서는 오래전부터 복어를 재료로하는 음식을 음주후 숙취를 제거하기 위하여 즐겨 먹는 기호 음식중의 하나이나, 복어에 대한 알코올 해독작용에 대하여는 연구된 보고들은 찾아보

기 어렵다. 이에 저자 등은 전보⁸⁾에서 alcohol의 급성 및 아급성 중독시 복어추출물을 투여하므로 alcohol의 일차 대사과정에 관여하는 ADH 및 MEOS가 alcohol 단독투여 때 보다 현저히 활성이 증가되며 이로 인해 혈중 alcohol 농도가 감소되어 alcohol의 해독에 복어추출물이 관여할 것이라고 보고하였으나 그 작용기전을 충분히 구명하지 못하였다. 그러므로 저자는 실험동물을 사용하여 alcohol의 급성 및 아급성 중독상태를 유도하고 alcohol의 대사산물인 acetaldehyde의 혈액 중 농도와 병행하여 Ald DH활성에 복어추출물이 어떤 영향을 주는가를 상호 비교 검토하였다.

재료 및 방법

복어 성분의 추출

시중에서 구입한 복어의 껍질을 음건한 다음 마쇄하

† To whom all correspondence should be addressed

고 Hashimoto 등의 방법⁹⁾에 준해 70% methanol에 가열하면서 3회 추출, 여과 및 감압 농축하고 ether을 첨가하여 지용성 부분을 제거한 수용성 분획(이하 복어 추출물이라 칭함)을 시료 1g당 280mg을 얻고 실험에 사용하였다.

동물의 처치

동물은 한국 실험동물개발로부터 분양받아 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 : $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 : 40~60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 2주동안 적응시킨 체중 150g내외의 Sprague-Dawley 계 웅성쥐를 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 주사하였으며, 아급성 alcohol중독군은 Liu 등의 방법¹¹⁾에 따라 25% alcohol용액을 물대신 임의로 6주간 섭취시켰다. Acetaldehyde의 투여는 Petterson 등의 방법¹²⁾에 준하여 사용할 때 마다 정제하여 생리 식염수에 용해하여 복강내에 100mg/kg을 주사하여 30분후에 실험에 사용하였으며, disulfiram (300mg/kg)의 투여는 P-owis와 Grant 등의 방법¹³⁾에 따라 olive oil에 현탁시켜 3일동안 1일 1회 복강내에 주사하였다. 급성 및 아급성 alcohol의 대조군은 alcohol과 동일 열량의 sucrose용액을 투여하였으며 시료투여시는 생리식염수 및 olive oil로 조절하였고, 실험동물은 처치전 24시간 절식 시킨후 사용하였다.

효소원의 조제

실험동물을 CO₂ gas로 가볍게 마취시킨 후 복부 정중선을 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 buffer (pH 7.4)를 가하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 Schneider¹⁴⁾의 방법에 준해 mitochondria분획을 분리하여 다음 실험의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C 이하에서 행하였으며, 채취한 혈액 및 간 마쇄액은 N,N-Dimethylformamide로 추출하여 acetaldehyde농도 측정에 사용하였다.

효소활성 측정

Aldehyde dehydrogenase (Ald DH)의 활성은 Inoue

등의 방법¹⁵⁾에 준해 반응액 4ml중 alcohol dehydrogenase의 활성을 억제하기 위하여 16.7mM pyrazole의 존재하에 기질인 60mM propionaldehyde와 조효소로서 13.3mM NAD 및 효소액 0.1ml를 70mM sodium pyrophosphate중에서 37°C에서 5분간 반응시킨후 생성되는 NADH를 340nm에서 흡광도를 읽고 표준 검량선에 준해 효소의 활성을 산정하였다. 효소의 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분간 반응하여 생성되는 NADH량을 nmole로 표시하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법¹⁶⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

Acetaldehyde농도 측정

Penton의 방법¹⁷⁾을 약간 변경하여 gas-chromatography (Shimadzu GC-RIA)로 분석하였으며 기기분석 조건은 column : 15% PEGS chromosorb WAW, 15×0.53 mm, FID detector temp. 150°C, Flow rate(carrier gas) 50ml/min (N₂), column temp. 130°C이었다.

통계처리

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

결과 및 고찰

복어추출물이 acetaldehyde농도에 미치는 영향

복어추출물을 2주간 전처리한 실험동물에 acetaldehyde 및 아급성 alcohol처치군에서의 혈액과 간조직중 acetaldehyde의 농도를 측정한 성적이 Table 1, 2이다. Acetaldehyde를 투여한 군에서 혈액 및 간조직중의 농도는 $48.7 \pm 6.7 \mu\text{g/ml}$ 와 $117.0 \pm 14.2 \mu\text{g/g}$ 인데 비해 복어추출물을 전처리하고 acetaldehyde를 투여하였을 때는 acetaldehyde의 농도가 혈액에서는 약 34%와 간조직에서는 18%정도 감소되었다. 한편 25% alcohol용액을 6주간 임의로 섭취케한 아급성 alcohol중독군에서는 acetaldehyde의 농도가 복어추출물을 처리하므로 대조군에 비하여 각각 약 29% 및 35%정도 감소하였다. 이로 보아 복어의 추출물 속에는 acetaldehyde의 혈중 농도를 감소시키는 물질이 함유되어 있을 것으로 생각되어진다.

생체내에서 복어추출물이 Ald DH의 활성에 미치는 영향

Alcohol용액을 투여하고 간 mitochondrial Ald DH의 활성에 복어추출물이 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 성적이 Fig. 1이다. 대조군의 활성도가 24.2±2.12 NADH nmole/mg protein/min인데 비해 alcohol 급성 투여군에서는 33.5±2.40 NADH nmole/mg protein/min로 약 38% 정도 효소의 활성이 증가되었으며, 복어추출물을 전처리하고 alcohol을 투여한 실험군에서는 alcohol단독 투여군보다 약 30%의 증가를 보였다. 한편 아급성 alcohol중독군에서는 본 효소의 활성이 대조군 보다 약 28% 감소되었고 alcohol을 섭취한 군에 복어추출물을 처리한 군에서는 Ald DH의 활성이 25.1±1.45 NADH nmole/mg protein/min로서 대조군 수준으로 증가되었다. Alcohol은 위 및 소장에서 쉽게 흡수되며 90%이상이 여러 단계의 대사 과정을 거쳐 체외로 배설되어진다^{18,19}. Alcohol은 주로 간에서 acetaldehyde로 산화되며²⁰, 이 acetaldehyde는 생체내에 반

응성이 강한 물질로 alcohol 중독의 주 원인 물질로 생각되어 지고있다.

Acetaldehyde의 산화에는 mitochondrial Ald DH가 중요한 역할을 담당하고 있으며²¹⁻²⁴ Ald DH에 의해 acetate로 산화되어지는데 복어추출물의 투여로서 급성 및 아급성 중독상태에서 Ald DH의 활성이 현저히 증가되었다. 이러한 점으로 보아 복어추출물은 acetaldehyde의 산화에 관여하는 효소의 활성을 유도하여 acetaldehyde의 침해로부터 생체를 방어할 것으로 추측되어진다.

Disulfiram 투여에 의한 Ald DH 활성 변동에 미치는 복어추출물의 영향

Disulfiram을 전처리한 정상동물과 5g/kg의 alcohol 용액을 투여한 군 및 복어추출물을 처리한 군에서 간 mitochondrial Ald DH의 활성이 어떠한 변동을 나타내는지 관찰한 성적이 Fig. 2이다. 정상 동물에 disulfiram을 투여하였을 때 대조군에 비해 본 효소의 활성이 8.9±0.97 NADH nmole/mg protein/min로 약 65% 현저히 감소되었으나 복어추출물을 전처리하고 disulfiram을 투여한 군에서는 22.7±1.98 NADH nmole/mg

Table 1. Effect of Puffer fish skin extract on the blood and hepatic acetaldehyde concentration in rats after acetaldehyde treatment

	Treatment	Concentration
Blood (µg/ml)	Acetaldehyde	48.7± 6.7 ^a
	PF + Acetaldehyde	32.0± 5.1 ^b
Hepatic (µg/g)	Acetaldehyde	117.0± 14.2 ^c
	PF + Acetaldehyde	95.8± 3.7 ^d

Acetaldehyde(100mg/kg) was injected intraperitoneally after Puffer fish skin extract (PF, 100mg/kg) p.o. treatment for 2 weeks. The animals were decapitated 30min after administration of acetaldehyde. 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)

Table 2. Effect of Puffer fish skin extract on the blood and hepatic acetaldehyde concentration in subacute alcohol-treated rats

	Treatment	Concentration
Blood (µg/ml)	Alcohol	35.2±4.6 ^c
	Alcohol + PF	24.9±3.3 ^b
Hepatic (µg/g)	Alcohol	93.4±5.4 ^c
	Alcohol + PF	61.0±4.2 ^d

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

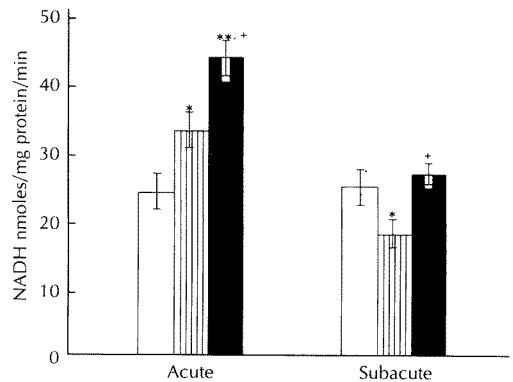


Fig. 1. Influence of Puffer fish skin extract on the hepatic mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity in acute and subacute alcohol-treated rats.

Acute treatment ; 5g/kg (30% wt/vol) of alcohol solution was injected intraperitoneally after Puffer fish skin extract (PF, 100mg/kg) p.o. treatment for 2 weeks. Subacute treatment ; rats were given 25% (v/v) alcohol solution for 6 weeks and PF p.o. treatment for 2 weeks. The animals were killed 180 min after administration of last dose of PF/The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 6 experiments.

□ ; Control ▨ ; Alcohol ■ ; PF + Alcohol
Significantly different from the control (*p<0.01, **p<0.001).
Significantly different from the alcohol (†p<0.01).

protein/min로 억제되던 효소의 활성이 정상 수준에는 미치지 못하나 증가되었다. 한편, disulfiram을 투여한 군에 alcohol을 투여함으로써 약 45%정도 본 효소의 활성이 억제되었으나 복어추출물의 투여로 대조군 수준으로 증가되었다. 이로부터 복어추출물 속에는 NAD의 전자를 전달하므로써 aldehyde의 산화를 조절하는 Ald DH^{25,26}의 활성을 증가시켜 aldehyde로부터 받는 손상에 대하여 생체를 방어하는 성분이 함유되어 있을 것으로 생각되어진다.

시험관내에서 Ald DH 활성에 미치는 복어추출물의 영향

Alcohol에 의해 유도된 Ald DH의 활성에 복어추출물의 처리로 효소의 활성이 증가되는 현상이 복어추출물의 직접적인 작용에 의해 나타나는 것인지를 검토할 목적으로 급성 alcohol중독을 야기시킨 효소원을 사용하여 Ald DH의 측정용 반응액중에 복어추출물의 첨가 농도를 증가시켜 가면서 Ald DH의 활성을 관찰한 성적이 Fig. 3이다. 복어추출물을 10⁻⁴g/ml까지 반응액 중에 첨가하여도 간조직중 Ald DH 활성은 대조치와 아무런 효소의 활성 변동은 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 보아 복어추출물의 투여에 의한 aldehyde 대사

효소인 Ald DH의 활성 증가현상은 복어추출물이 효소의 활성에 직접적인 영향을 주므로써 나타나는 것은 아닌 것으로 추측된다. 이러한 실험 결과들과 문헌상의 지견들을 종합하여 볼 때 복어추출물은 aldehyde류를 산화시키는 Ald DH의 활성을 증가시켜 체내 acetaldehyde의 농도를 감소시키며 나아가 alcohol중독의 치료 및 예방의 목적으로 이용될 수 있는 가능성을 시사하고 있으며, 또한 acetaldehyde에 의한 유해 작용으로부터 생체를 보호할 것으로 사료된다.

요 약

복어추출물이 acetaldehyde의 산화 효소에 어떤 영향을 주는가를 관찰할 목적으로 실험동물에 복어추출물을 투여한 다음 acetaldehyde의 대사에 미치는 영향을 관찰하였다. 복어추출물(100mg/kg)을 2주간 전처리하고 acetaldehyde(100mg/kg)를 투여하므로 혈액 및 간조직중 acetaldehyde의 농도가 acetaldehyde 단독 투여군보다 현저히 감소되었다. 한편, 25% alcohol 용액을 6주간 섭취제한 군에서도 복어추출물의 투여로 acetaldehyde의 농도가 감소됨을 관찰하였다. 복어추출물을 전처리하고 5g/kg의 alcohol용액을 투여한 급성 중독실험에서 mitochondrial aldehyde dehydrogenase(Ald DH)의 활성이 alcohol 단독투여군 보다 약 30% 증가되었다. 25% alcohol용액을 6주간 섭취제한 흰쥐에 복어추출물을 투여하므로 Ald DH의 활성이 alc-

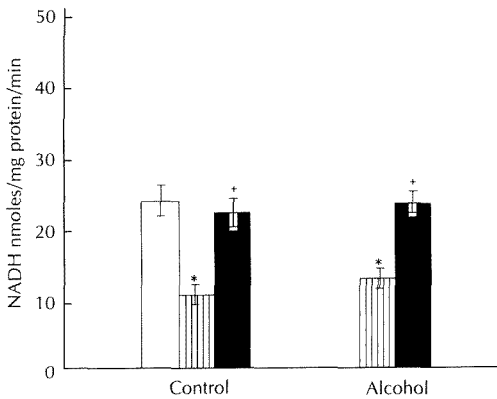


Fig. 2. Influence of Puffer fish skin extract on the hepatic mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity in disulfiram-treated rats.

Rats were treated with Puffer fish skin extract(PF, 100 mg/kg) p.o. treatment for 2 weeks and disulfiram(300 mg/kg) was administered to rat by intraperitoneally injection for final 3 days after the last injected 90 min before administration of 5g/kg of alcohol solution. The other conditions were described the same as in the Fig. 1.

□ ; Normal ▨ ; Disulfiram ■ ; PF + Disulfiram
Significantly different from the normal (*p<0.01).
Significantly different from the disulfiram (‘p<0.01).

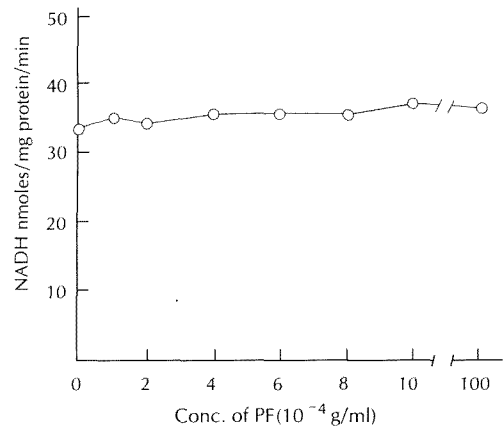


Fig. 3. Changes on the hepatic mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity in various concentration of Puffer fish skin extract in acute alcohol-treated rats in vitro.

The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean for 5 separate experiments.

ohol의 단독투여로 억제되던 현상이 회복되었다. Disulfiram(300mg/kg)을 3일간 투여하므로 정상 동물군과 alcohol 투여군에서 Ald DH활성이 억제되던 것이 복어추출물의 투여로 정상 수준에 가깝게 증가되었다. 시험관내 실험에서 alcohol의 투여로 유도된 효소원에 복어추출물을 10mg/ml까지 첨가하였으나 본 효소의 활성에는 별다른 영향이 없었다. 이상의 실험결과 복어추출물은 Ald DH의 활성을 조절하므로써 급성 및 아급성 alcohol 중독의 해독에 사용될 수 있는 가능성을 시사한 것으로 사료된다.

문 헌

1. Rahwan, R. G. : Speculations on the biochemical pharmacology of ethanol. *Life Sciences*, **15**, 617(1975)
2. Iseri, O. A., Lieber, C. S. and Gottlieb, L. S. : The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am. J. Pathol.*, **48**, 535(1966)
3. Cederbaum, A. I., Lieber, C. S. and Rubin, E. : The effect of acetaldehyde on mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta*, **161**, 26(1974)
4. Irle, C., Kocher, O. and Gabbiani, G. : Contractility of myofibroblasts during experimental liver cirrhosis. *J. Submicrosc. Cytol.*, **12**, 209(1980)
5. Hasumura, Y., Teschke, R. and Lieber, C. S. : Acetaldehyde oxidation by hepatic mitochondria. : Decrease after chronic ethanol consumption. *Science*, **189**, 727(1975)
6. Korsten, M. A., Matsuzaki, S., Feinman, L. and Lieber, C. S. : High blood acetaldehyde levels following ethanol administration. : Differences between alcoholic and non-alcoholic subjects. *N. Engl. J. Med.*, **292**, 386(1975)
7. Nomura, F. and Lieber, C. S. : Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes : Enhancement after chronic alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 131(1981)
8. 김동훈, 김동수, 최종원 : Alcohol 섭취 rat에서 alcohol의 대사효소계에 미치는 복어추출물의 효과. *한국영양식량학회지*, **23**, 181(1994)
9. 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)
10. Kato, S., Kawase, T., Alderman, J., Inatoma, N. and Lieber, C. S. : Role of xantine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology*, **98**, 203(1990)
11. 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)
12. Pettersson, H. and Kiessling, K. H. : Acetaldehyde occurrence in cerebrospinal fluid during ethanol level oxidation in rats and its dependence on the blood level and on dietary factors. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 237(1977)
13. Powis, G. and Grant, L. : The effect of inhibitors of alcohol metabolism upon the changes in the hepatic microsomal metabolism of foreign compounds produced by the acute administration of some alcohols to the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2197(1976)
14. Schneider, W. C. : Methods for the isolation of particulate components of the cell. In "Manometric techniques" Umbreit, W. W., Rurris, R. H. and Stauffer, J. F. (eds.), Burgess Publishing CO., Minneapolis, p.177(1964)
15. Inoue, K., Fukunaga, M. and Yamasawa, K. : Correlation between humane erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity and sensitivity to alcohol. *Biochem. Behav.*, **13**, 295(1980)
16. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1957)
17. Penton, Z. : Gas-chromatographic determination of ethanol in blood with 0.53mm fused-silica open tubular columns. *Clin. Chem.*, **33**, 2094(1987)
18. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase, activity enhanced by ethanol consumption. *Science*, **170**, 78(1970)
19. Lieber, C. S. : Alcohol and the liver. *Hepatology*, **4**, 1243(1984)
20. Agarwal, D. P., Harada, S., Goedde, H. W. and Schrappe, O. : Cytosolic aldehyde dehydrogenase and alcoholism. *Lancet*, **i**, 68(1983)
21. Smith, L. and Packer, L. : Aldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 270(1972)
22. Steinmetz, P. R. : Liver adaptation and injury in alcoholism. *New Engl. J. Med.*, **288**, 356(1973)
23. Lindros, K. O. : Acetaldehyde-its metabolism and role in the actions of alcohol. *Rev. Adv. Alcohol Drug Problems*, **4**, 111(1978)
24. Jaenkos, W. J., Cakebread, K. and Palmer, K. R. : Hepatic aldehyde dehydrogenase and alcoholism. *Lancet*, **ii**, 1275(1982)
25. Eneanya, D. L., Bianchine, J. R., Duran, D. O. and Andresen, B. D. : The actions and metabolic fate of disulfiram. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 575(1981)
26. Sanny, C. G. and Weiner, H. : Inactivation of horse liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by disulfiram : Enhance that disulfiram is not active site-directed reagent. *Biochem. J.*, **242**, 499(1987)

(1994년 2월 26일 접수)