J. Korean Soc. Food Nutr.
24(6), 859~866(1995)

만성 알코올 섭취시 2-Acetylaminofluorene 투여가 흰쥐 간 Cytochrome P-450 및 Glutathione 이용 효소계 활성에 미치는 영향

최옥희 · 윤혜진 · 김정희†
서울여자대학교 영양학과

Effects of Chronic Alcohol Feeding and 2-Acetylaminofluorene Treatment on Microsomal Cytochrome P-450 and Glutathione Dependent Enzymes Activities in Rat Liver

Ok-Heui Choi, Hye-Jin Yoon and Jung-Hee Kim†
Dept. of Nutrition, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract

This study was done to investigate the effects of chronic ethanol feeding on hepatic microsomal cytochrome system, lipid peroxidation and peroxide metabolizing enzyme activities in 2-acetylaminofluorene (2-AAF) treated rats. Male Sprague-Dawley rats, weighing 120~125g, were pair-fed liquid diets containing 35% of total calories either as ethanol or isocaloric carbohydrates for 6 weeks. After 4 weeks of experimental diet feeding, 2-AAF (100mg/kg body weight) was injected twice a week intraperitoneally. Body weight and percent liver weight per body weight were significantly changed by ethanol feeding. Hepatic microsomal lipid peroxide value and the activities of glutathione (GSH) peroxidase and GSH reductase were not changed by either ethanol or 2-AAF treatment. However the analysis of cytochrome systems showed that both ethanol and 2-AAF increased cytochrome P-450 and b_5 contents although cytochrome P-450 content was more affected by 2-AAF while cytochrome b_5 content by ethanol. Cytosolic GSH S-transferase activity, which is often elevated during chemical carcinogenesis, also significantly increased by either ethanol feeding or 2-AAF treatment. Overall values for the cytochrome contents and GSH S-transferase activities were highest in 2-AAF treated rats fed ethanol. These results might support the hypothesis that the increase in liver cancer risk associated with chronic ethanol consumption might be due to, at least in part, enhancement of carcinogen bioactivation by ethanol.

Key words : ethanol, 2-AAF, cytochrome P-450, glutathione-dependent enzymes

서 론

알코올을 소량 섭취시에는 기분을 좋게 하고 혈액순환을 증진시키며 항동맥경화인자인 HDL-cholesterol의 함량을 증가시키는 등 인체에 이로운 효과를 줄 수도 있으나(1), 과량을 섭취하거나 만성적으로 섭취시에는 여러가지 알코올에 의한 독성 효과가 나타나 심하면 간 조직의 구조 및 기능에 치명적인 손상을 가져오게 된다(2).

간에서의 알코올 산화는 주로 alcohol dehydrogenase에 의해서 일어나며 일부는 peroxisome의 catalase에 의해서 산화가 된다. 그러나 과량의 알코올을 섭취하거나 만성적으로 알코올을 섭취할 때 소포체의 증식과 함께 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)의 활성이 증가한다(3). 따라서 Ohnishe와 Lieber(4)는 알코올을 장기 투여한 흰쥐에서 microsomal oxidizing system의 활성 증가는 hepatic cytochrome P-450의 양적, 질적 변화에 의한다고 하였다. 즉 알코올 투여로 유발된 cytochrome P-450 (P450 IIE)은 phenobarbital이나 polycyclic hydrocarbon 등 다른 유발 인자에 의해 유도된 cytochrome P-450과는 기질특이성이 다르다(5).

Cytochrome P-450은 체외에서 들어오는 다양한 약물들을 대사시키는 소포체의 mixed function oxidase (MFO) system의 구성 요소로서 알코올과 2-acetylaminofluorene

†To whom all correspondence should be addressed

(2-AAF) 같은 외부 물질에 의해 유도되어 알코올 대사 및 발암물질 대사에 중요한 역할을 한다. 특히 2-AAF는 생체에서 궁극적인 발암물질로 작용하기 위해서는 대사적 활성화를 필요로 하며, cytochrome P-450 system에 의해 활성화된다(6). 따라서 만성적인 알코올 섭취는 cytochrome P-450계를 유발시켜 2-AAF 같은 발암물질의 대사적 활성화를 더욱 조장하여 발암 위험도를 증가시키거나(7) 또는 대사과정에서 유리래디칼을 생성하여 조직의 지질과산화반응을 증가시켜(8,9) 암의 발생에 영향을 미칠 수 있다. 그러나 MFO system을 통한 알코올 대사나 발암물질 대사시 생성되는 유리래디칼은 radical scavenger를 사용하거나 생체계의 해독 효소계를 유도하여 제거될 수도 있다(10,11).

한편 과량의 알코올 섭취는 영양 상태에도 심각한 영향을 미쳐서 영양 불량의 원인이 된다. 즉 알코올은 비교적 높은 열량을 공급하나 알코올 섭취로 인하여 식이 섭취량이 감소되어 영양 부족 증세를 나타낼수도 있고, 장점막 손상에 의한 영양소의 흡수 불량과 알코올 그 자체에 의한 영양소의 흡수저해 등으로 영양 결핍을 초래하며(12,13) 더구나 과량의 알코올을 만성적으로 투여시 간에서의 비타민 A의 고갈을 초래하여 알코올성 간 질환을 더욱 쉽게 유발시킬 수 있다(14). 따라서 영양 결핍 효과를 배제한 알코올 자체의 독성 효과만을 알아보기 위해서는 충분한 영양보충과 함께 연구가 이루어져야 하는데 이와 같은 목적으로 Lieber와 DeCarli(15,16)는 액체식이를 고안하여 실험동물에게 총 열량의 36%를 알코올로 공급하여 대조군과 비교함으로써 알코올 자체의 독성 효과를 판정할 수 있게 하였다.

따라서 본 연구에서는 Lieber와 Decarli(16)에 의해서 고안된 액체식이로 알코올을 장기 투여한 흰쥐의 간조직내 microsomal cytochrome P-450계와 과산화물 및 과산화물대사효소 특히 glutathione 이용 효소들의 활성에 미치는 영향을 살펴보고 아울러 간암의 발암원으로 알려진 2-AAF를 투여하여 이들 대사효소들에 미치는 상호 효과를 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물, 실험식이 및 처치

Sprague-Dawley종 숫쥐 120~125g된 것을 서울대학교 의과대학 실험동물 사육장으로 부터 공급받아 정상조건에서 사육하였으며 일반사료로 6일간 적응시킨 후 처음에는 대조군과 알코올군 2군으로 나누어 각 군당 20마리씩 나누어 실험식이로 6주간 사육하였으며, 실험식이를 공급한지 4주 되었을 때 각 군을 다시 두군으로 나누어 한군은 발암물질인 2-AAF를 polyethyleneglycol 300에 녹여 체중 kg당 100mg 수준으로 투여하였고, 대조군은 polyethyleneglycol 300을 투여하여 총 4군으로 하였다.

식이성분은 Lieber와 Decarli의 액체식이(16)를 변형하여 사용하였고 알코올군에서의 알코올 함량을 총 열량의 35%로 공급하였다. 액체식이에 포함된 열량은 대조군(protein : fat : carbohydrate : ethanol=180 : 150 : 670 : 0)과 알코올군(protein : fat : carbohydrate : ethanol =180 : 150 : 320 : 350)으로 나누어 1 liter당 1000kcal가 되도록 하였다. 식이 섭취는 pair-feeding으로 하였으며 식이 조성과 실험설계는 각각 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다.

시료의 수집

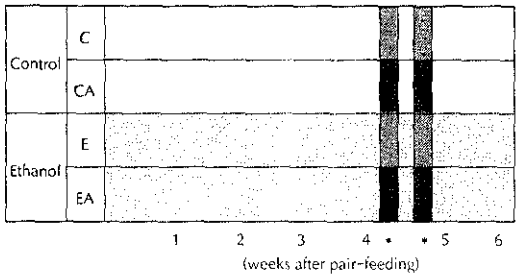
시료의 수집은 2-AAF를 2번 복강 투여하고 9일이 경과된 후에 실험동물을 12시간 금식시켜 단두하여 희생시킨 후 찬 생리식염수로 간을 perfusion한 뒤에 간을 절제하여 세척한 다음 중량을 측정하였고, 7g의 간을 일정한 부위에서 취하여 buffer(0.25M sucrose, 50mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA-disodium pH 7.4) 용액에서 homogenizer로 간 균질액을 만들었다. 이 간 균질액을 4°C 10,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액만을 다

Table 1. Composition of liquid diet (g/L, 1000kcal)

Group / Ingredient	Liquid diet	
	Control	Ethanol
Casein	41.4	41.4
DL-Methionine	0.8	0.8
Corn oil	17.0	17.0
Dextrin	169.1	80.7
Ethanol	-	49.3
Salt mixture[1]	12.7	12.7
Vitamin mixture[2]	1.0	1.0
Xanthan gum	2.5	2.5
Total	243.5	204.4

[1]Composition of salt mixture (g/L,1000kcal) : Calcium lactate 5g, NaCl 1.02g, KCl 1.09g, KH_2PO_4 1.85g, NaH_2PO_4 1.38g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.04g, KI 0.008g, Ferric citrate 0.29g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.044g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.15g, Zinc carbonate 0.06g, Na_2SeO_3 0.0001g, $CrK(SO_4)2 \cdot 12H_2O$ 0.005g

[2]Vitamin mixture (mg/L of diet, 1000kcal) : Thiamin hydrochloride 1.5mg, Riboflavin 1.5mg, Pyridoxine hydrochloride 1.75 mg, Calcium pantothenate 5mg, Niacin 7.5mg, Choline chloride 250mg, p-aminobenzoic acid 12.5mg, Biotin 0.05 mg, Inositol 25mg, Menadione 0.5mg, Vit. B_{12} 1.75mg, Folic acid 0.5mg, Vitamin A retinyl acetate (1500IU/mg)-3.68mg, Ergocalciferol 0.17mg, α-tocopherol (19IU/g)-260mg, Ascorbic acid 10mg and dextrose to make 1g



: Control group
: Ethanol group
: 1.5ml PEG 300/kg of body weight as control
: 100mg of 2-AAF in 1.5ml PEG 300/kg of body weight
* : Intraperitoneal injection

Fig. 1. Experimental design.

시 4°C 30,500rpm에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상층액을 얻었다. 그 상층액은 cytosol 분획으로 사용하였고 pellet은 1.15% KCl solution에 재 현탁시킨 후 microsome 분획으로 사용하였다. 각 fraction은 일정량씩 나누어 eppendorf tube에 담아 액체 질소에 급속 냉동시킨 뒤 −40°C에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다.

지질과산화물의 함량 측정

간 microsome의 지질과산화물은 thiobarbituric acid (TBA) 방법 (17)을 이용하여 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 측정하였으며 표준용액으로는 tetraethoxypropane (TEP)을 사용하였다.

Glutathione dependent enzymes 활성도 측정

Cytosol GSH-peroxidase의 활성도는 Paglia와 Valentine의 방법 (18)을 개선한 Tappel의 방법 (19)을 이용하여 기질로 cumene-hydroperoxide를 사용하였다.

Cytosol의 GSH-reductase의 활성도는 Carlberg와 Mannervik의 방법 (20)으로 측정하였다. GSH은 GSH-peroxidase에 의해 GSSG로 산화되고 이것이 다시 GSH-reductase와 NADPH에 의해 GSH로 환원될 때 NADPH는 산화되는데 이때 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 340nm에서 측정하였다. GSH-peroxidase 및 GSH-reductase의 활성도는 mg protein당 1분 동안 산화되는 NADPH의 nmol 수로 표시하였다.

Cytosol의 GSH S-transferase (GST)의 활성도는 chlorodinitrobenzene (CDNB)와 GSH를 기질로 사용하는 Habig 등의 방법 (21)을 사용하여 측정하였다. GST의 활성도는 340nm에서 mg protein당 1분 동안 conjugated 되는 CDNB의 nmol수로 표시하였으며 conjugated CDNB의 molar extinction coefficient를 9.6$mM^{-1}cm^{-1}$로 계산하였다.

Cytochrome P-450 및 cytochrome b5 함량 측정

Microsome의 cytochrome P-450 함량은 Omura와 Sato의 방법 (22)으로 측정하였다. Microsomal fraction을 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)로 희석시켜 단백 농도가 1mg/ml 되게 한 다음 reference cell과 sample cell에 microsome suspension을 넣은 다음 3~4mg의 sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$)를 첨가한 뒤 400~500nm 사이에서 scanning을 하여 base line을 설정한 다음 sample cell에 CO gas를 1 bobble/sec 속도로 30~40초간 bobbling 시킨 후 400~500nm에서 rescanning을 하였다. Cytochrome P-450 함량은 450nm와 490nm의 최대 흡광도 간의 차이로 계산하였으며 molar extinction coefficient는 91$mM^{-1}cm^{-1}$로 하였다.

Microsome의 cytochrome b5 함량 측정은 Matsubura 등 (23)의 방법으로 측정하였다. Microsomal suspension을 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)으로 희석하여 단백 농도가 1mg/ml 되게 한 다음 reference cell과 sample cell에 1.0ml씩 넣고 400~500nm에서 scanning을 하여 base line을 설정한 다음 sample cell에 3~4mg의 sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$)를 처리하여 400~500nm에서 rescanning하였다. Cytochrome b5 함량은 426nm와 410nm의 최대 흡광도 간의 차이로 계산하였다.

단백질의 함량 측정

간 cytosol 및 microsome의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry의 방법 (24)으로 측정하였다.

통계처리

통계처리는 SAS를 이용하였으며 모든 값은 평균과 표준오차로 나타내었다. 알코올 섭취와 2-AAF 투여의 상호작용을 검증하기 위하여 two-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였고, 각 군의 평균치의 비교는 least significant difference technique (LSD)에 의해서 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

체중, 간무게에 미치는 영향

알코올 중독 환자를 대상으로 연구한 여러 실험에서 (12,13) 알코올 섭취시 식이 섭취량의 감소와 여러 영양소들의 흡수 감소로 인하여 체중 감소를 초래한다고 보고했다. 그러나 Lieber와 Decarli (25)는 식이 섭취량의

감소에 따른 영양결핍 효과를 배제하기 위하여 알코올을 열량의 36%를 쥐에 투여한 후 알코올 투여군과 pair-fed 대조군을 비교하였는데 이 때에도 알코올군에서 체중 감소와 함께 여러 가지 병리 현상이 나타남을 보고하였다. 이런 체중감소 현상의 이유로는 알코올 섭취시 알코올 자체의 독성 효과로 소화율의 저하와 여러 영양소의 불충분한 흡수에 기인한다고 한다. 그 이외에도 과량의 알코올 섭취시 에너지 효율의 감소를 초래하여 체중감소를 일으킬 수 있다(12). 따라서 본 실험에서도 Sprague-Dawley종 숫쥐에게 생후 10주 부터 6주 동안 알코올을 열량의 35% 섭취시킨 결과 체중이 pair-fed 대조군 보다 유의적으로 감소되었다(Table 2). 본 실험에서 특히 알코올 섭취와 2-AAF를 함께 투여한 군(EA)이 가장 많은 체중감소를 보였다.

간 무게는 알코올 섭취시 간이 비대해진 것을 알 수 있었고 육안으로 보아 간이 지방간으로 변해 있었고 섬유질화되어 있었다. 여러 연구에서 과량의 알코올 섭취시 이런 형태학적 변화는 3~4주 후 부터 나타난다고 하며 간에서의 비타민 A 결핍 때문에 이런 증세는 더욱 심각해진다고 한다(26,27).

체중에 대한 상대적인 간무게(%)는 2-AAF에 의한 유의적인 변화를 관찰할 수 없었는 데 이것은 AAF 투여시기가 어느 정도 성장한 쥐(생후 9주쯤)에게 투여한 것으로 어린 쥐에 의한 2-AAF 영향과는 다를 수 있다고 생각된다.

지질과산화물의 함량에 미치는 영향

Microsome의 cytochrome P-450 dependent MFO system은 발암물질 등 약물을 대사시키는 과정에서 $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2를 생성하기 때문에 발암물질이나 알코올에 의한 MFO system의 활성도 증가는 지질과산화반응을 일으킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(28).

특히 많은 동물실험에서 급성 혹은 만성적인 알코올 투여가 lipid peroxidation을 증가시킴이 보고되었고(29) 유사한 결과가 인체실험에서도 관찰되었으며 이때 각종 항산화제가 손상을 억제한다고 하였다(30). 그러나 본 실험에서는 알코올이나 발암물질 투여시 모두 malondialdehyde(MDA) 측정에 의한 지질과산화물 함량에 유의적인 차이가 없었으며(Table 3), 이는 일부 실험에서는 알코올 투여 후 지질과산화 정도를 측정하는 지표의 하나인 conjugated diene의 증가를 관찰할 수 없었다는 보고(31)와 일치한다. 따라서 일부 연구자는 알코올과 지질과산화에 대한 의문을 제기하였으나 이와 같은 상반된 결과는 지질과산화를 측정하는 방법과 시료의 차이에 기인함에 있다고 최근 Cederbaum(32)은 지적하였다.

또한 본 실험에서 알코올과 2-AAF 투여에 의해서 지질과산화물 생성이 유의적으로 증가하지 않았고 또한 지질과산화물의 값이 다른 문헌에서 보고된 값 보다 약간 낮음을 알 수 있는데 그 이유로는 실험식이 제조시 비타민 E의 함량이 Lieber와 Decarli(16) 식이의 비타민 E 함량 보다 1.5배 정도로 많은 양이 투여되어 비타민 E 보강에 의하여 지질과산화가 억제되었기 때문이라고 추측된다. 또 다른 이유로는 lipid peroxide 측정 방법상의 문제로써 최근 MDA 함량 측정이 지질과산화를 측정하는 좋은 지표가 아님이 일부에서 지적되고 있다. 따라서 지질과산화물 측정시 MDA 측정 방법외 다른 방법으로의 측정이 함께 병행되는 것이 바람직하다고 생각된다. 일반적으로 lipid peroxide를 측정하는 방법으로 diene conjugated, alkanes 등의 다양한 방법이 이용

Table 3. Effect of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on the hepatic microsomal lipid peroxide values in rats[1]

Group	TBA value (nmol MDA/min/mg protein)
Control (C)	0.014±0.001[NS]
Control-AAF (CA)	0.012±0.002
Ethanol (E)	0.014±0.004
Ethanol-AAF (EA)	0.018±0.005

[1]Values are mean±S.E. (n=5)
[NS]Not significant

Table 2. Effects of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on body weight and liver weight in rats[1]

Group	Body weight (g)	Liver weight (g)	LW/BW
Control (C)	225.77± 4.65[b]	9.40±0.20[a]	4.11±0.04[a]
Control-AAF (CA)	227.25± 4.62[b]	9.00±0.35[ab]	3.91±0.10[a]
Ethanol (E)	175.40± 9.11[a]	10.64±0.63[ab]	6.06±0.44[b]
Ethanol-AAF (EA)	161.00±10.43[a]	10.85±0.88[b]	6.80±0.31[b]

[1]Values are mean±S.E. (n=8)
[a,b]Means with the same superscripts within a column are not significantly different at $p<0.05$ by LSD test. By two-way ANOVA, ethanol effect for body weight, liver weight and liver weight per body weight was significant at $p<0.0001$, 0.0082 and 0.0001, respectively

되고 있으며 특히 최근에는 보다 정확하게 알코올에 의한 지질과산화 정도를 명확히 밝히는데 ESR (electron spin resonance) spectroscopy를 이용하여 lipid carbon-centered 라디칼을 측정하기도 한다(33).

Glutathione dependent enzymes 활성도 변화에 미치는 영향

생체는 산소 라디칼을 제거하는 기전으로써 라디칼 제거 효소계를 이용하거나 내인성 혹은 외인성 항산화제를 사용하여 세포를 보호하는 기능이 있다. 라디칼을 제거하는 효소계 중 *glutathione*을 이용하는 효소계가 알코올 섭취에 따른 산소 라디칼성 유래 조직손상에 대한 보호 장치가 큰 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 측정한 cytosol의 GSH-peroxidase 및 GSH-reductase 활성도는 알코올이나 2-AAF 투여에 따른 유의적인 차이가 없었다(Table 4). 이는 곽 등(34)의 실험에서 알코올을 쥐에게 급성과 만성으로 섭취시킨 실험에서 GSH-peroxidase나 GSH-reductase 활성도의 변화가 없음을 보여준 것과 유사하였다. 그러나 윤과 최(35)의 실험에서는 2-AAF 투여에 의해 GSH-peroxidase 활성도가 증가함을 보고하였고 이는 MFO system에 의해 생성된 radical이 간접적으로 GSH-peroxidase에 의해 제거되었음을 의미한다. 그러나 본 실험에서는 알코올 섭취나 2-AAF 투여에 의해 지질과산화물 함량에 어떤 변화를 주지 못했고 동시에 이런 지질과산화물을 대사시키는 GSH-peroxidase나 GSH-reductase의 활성도에도 어떤 변화를 주지 못한 것으로 생각된다.

Glutathione S-transferase는 이물질 (xenobiotics)이 체내에서 대사되는 과정에서 생성되는 electrophilic compounds를 대사시켜 glutathione의 -SH groups과 결합시켜 더 배설되기 쉬운 형태로 만들어 줌으로서 해독과정에 관여하며, Se-independent GSH peroxidase 활성도를 가지고 있어 지질과산화 반응으로 부터 생체를 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(36). 본 실험에서 GST 활성도는 알코올 섭취에 의해 유의적으로 증가하였으며 이러한 GST 활성도의 증가는 합성이 유도되거나 촉매효율이 증가된 것이라고 생각되며 또한 만성적인 알코올 섭취 시 간 세포질과 소포체의 GST의 활성도가 증가하였다는 다른 보고(37)와도 일치한다. 또한 GST 활성도는 발암과정에서 증가됨이 관찰되며 최근에는 많은 GST의 isoenzyme들이 밝혀지고 있으며 각 isoenzyme들의 생화학적 기능에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다(38).

2-AAF에 의해 GSH S-transferase 활성도는 유의적으로 ($p<0.01$) 증가하였으며 특히 알코올 보다는 2-AAF 투여가 GST 활성도를 증가시키는 효과가 더 컸다(Table 4). 따라서 알코올과 2-AAF를 동시에 투여한 군(EA)의 GST 활성도가 가장 높게 나타났다. 이는 발암과정에서 GST 활성도가 증가되는 다른 보고(37,39)와 유사한 것으로 만성적인 과량의 알코올 섭취는 발암과정과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

Microsome의 cytochrome P-450 및 cytochrome b_5 함량에 미치는 영향

Microsome의 cytochrome P-450 및 cytochrome b_5 함량에 대한 알코올의 효과는 cytochrome P-450는 유의적인 차이는 없으나 증가하는 경향이 있고 cytochrome b_5는 알코올군이 대조군 보다 유의적 ($p<0.0028$)으로 증가하였다(Table 5). 이는 유(40)의 알코올 투여군이 대조군에 비하여 cytochrome b_5가 증가하였다는 실험과 일치하는 것으로 cytochrome b_5는 MFO계에 전자를 전달해 주는 보조효소로 알려져 왔다.

최근 연구에 의하면 MFO 대사의 중추인 cytochrome P-450의 여러 분자형의 존재와 이들 상이한 분자형태들의 기질특이성 및 유발가능성이 입증되었고(5) 또한 이들이 간세포에서 화학적 발암물질을 포함한 수많은

Table 4. Effects of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on the hepatic cytosolic glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rats[1]

Group	Glutathione peroxidase	Glutathione reductase	Glutathione S-transferase
	(nmol NADPH oxidized/min/mg protein)		(nmol CDNB conjugated/min/mg protein)
Control (C)	233.47±26.31[NS]	41.15±1.58[NS]	328.02±20.83[a]
Control-AAF (CA)	196.07± 7.25	46.57±4.10	452.65±53.18[ab]
Ethanol (E)	206.90±11.02	47.99±1.95	419.58±37.90[a]
Ethanol-AAF (EA)	205.17±17.14	45.42±7.55	581.81±75.27[b]

[1]Values are mean±S.E. (n=5)

[a,b]Means with the same superscripts within a column are not significantly different at $p<0.05$ by LSD test. By two-way ANOVA, ethanol effect and 2-AAF effect for glutathione S-transferase were significant at $p<0.0377$ and $p<0.0101$, respectively

[NS]Not significant

Table 5. Effects of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on cytochrome P-450 contents and cytochrome b5 in rat liver microsome[1]

Group	Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	Cytochrome b5 (nmol/mg protein)
Control (C)	0.71±0.03[a]	0.42±0.02[a]
Control-AAF (CA)	1.09±0.24[a]	0.48±0.01[a]
Ethanol (E)	0.87±0.08[a]	0.60±0.05[ab]
Ethanol-AAF (EA)	1.87±0.48[b]	0.73±0.11[b]

[1]Values are Mean±S.E. (n=5)

[ab]Means with the same superscripts within a column are not significantly different at $p<0.05$ by LSD test. By two-way ANOVA, 2-AAF effect for cytochrome P-450 and ethanol effect for cytochrome b5 were significant at $p<0.0232$ and $p<0.0028$, respectively

이물질의 활성화와 해독작용에도 각각 다양한 방법으로 참여함도 밝혀졌다(41).

또한 2-AAF 투여군에서 cytochrome P-450 함량이 증가된 본 실험의 결과는 2-AAF가 cytochrome P-450을 유도하여 그 자신의 대사를 촉진시킨다는 여러 보고와 일치한다(6,40). 그러나 cytochrome P-450 dependent MFO system은 2-AAF를 활성화시키기도 하지만 해독작용에도 관여한다. 즉 microsome의 MFO system이 유도됨으로서 화학물질에 의한 암 유발 가능성이 높아질 수 있으나 MFO system의 활성에 의해 다른 2차 반응이 빠르게 진행되어 발암유도가 감소될 수도 있다. 이에 따라 MFO system을 유도하는 식이는 발암물질에 대해 생체의 대응능력을 변화 시킴으로서 암의 발생을 감소시킬 수도 있고 증가시킬 수도 있다. 그러나 유(40)의 보고에 의하면 알코올의 섭취는 2-AAF의 N-hydroxylation을 증가시키며 ring-hydroxylation에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 2-AAF는 MFO계에 의해서 활성화될 때 hydroxylation 되는 위치에 따라 N-hydroxylation과 비활성 과정인 ring-hydroxylation으로 대사되며 이 중 N-hydroxylated 2-AAF가 강력한 간암 유도 물질이라고 알려져 있다. 비타민 A, E의 섭취가 이런 작용을 어느 정도 억제하는 것으로 보고 하였다(42). 따라서 본 실험에서 만성적인 알코올의 섭취가 발암물질의 대사를 촉진하여 간암을 촉진할 가능성이 큰 것으로 예측된다.

요 약

본 연구에서는 액체식이로 알코올을 열량의 35%로 6주간 섭취시킨 흰쥐의 간조직내 지질과산화물과 glutathione 이용효소계의 활성도 및 cytochrome P-450에 미치는 영향을 살펴보고 아울러 간암의 발암원으로 알려진 2-AAF를 투여하여 이들의 상호효과를 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 1. 체중, 간무게, 그리고 체중에 대한 간무게의 알코올에 대한 효과는 유의적인 차이를 보여 체중은 알코올 섭취군이 유의적으로 감소하였고 간무게 및 체중에 대한 간무게는 알코올군이 유의적으로 증가하였다. 2. Microsome의 지질과산화물 함량 및 cytosol의 glutathione peroxidase, glutathione reductase 활성도는 알코올과 2-AAF 투여시 모두 유의적인 차이를 보이지 않았으나, cytosol의 glutathione S-transferase 활성도는 알코올과 2-AAF에 의해서 모두 유의적으로 증가하였고 알코올 섭취와 함께 2-AAF 투여시 GST 활성도가 가장 많이 증가하였다. 3. Microsome의 cytochrome P-450 및 cytochrome b5 함량에 대한 알코올 효과는 cytochrome P-450 함량을 증가시키는 경향이 있고 cytochrome b5는 유의적인 증가를 보여 주었으며 2-AAF 투여 역시 cytochrome P-450의 유의적인 증가를 유도하였다. 따라서 알코올 섭취와 2-AAF 함께 투여 시 cytochrome P-450의 함량이 대조군의 약 2.2배 정도 증가하였으며 cytochrome b5 함량이 1.7배로 높이 증가하였다. 이는 2-AAF가 cytochrome P-450을 유도하여 자신의 대사를 촉진시키며 알코올의 섭취 또한 2-AAF의 hydroxylation을 증가시킬 수 있는 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 과량의 알코올을 만성적으로 섭취시 간조직내의 microsome의 MFO system에 영향을 미쳐서 발암물질의 생체 활성화를 촉진시킬 수 있고 또한 GST의 활성도를 증가시키므로 어느 정도 발암과정에 영향을 미치는 것으로도 생각된다.

문 헌

1. Hartung, G. H., Foreyt, J. P. and Michell, R. E. : Effect of alcohol intake on high density lipoprotein cholesterol levels in runners and inactive men. *JAMA*, **249**, 747 (1983)
2. Lieber, C. S. and Leo, M. A. : Alcohol and liver. In "*Medical and nutritional complications of alcoholism : mechanisms and management*" Lieber, C. S. (ed.), Plenum Medical Book Company, p.185 (1992)
3. Liber, C. S. and DeCarli, L. M. : Hepatic microsomal ethanol oxidizing system : *In vitro* characteristics and adaptive properties *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2505 (1970)
4. Ohnishi, K. and Lieber, C. S. : Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7124 (1977)
5. Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R.

and Waterman, M. R. : The P-450 gene superfamily : Recommended nomenclature. *DNA*, **6**, 1 (1987)
6. Maleijka, J. : Introduction of microsomal N-hydroxylation of N-2-fluorenylacetamide in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 61 (1978)
7. Garro, A. J., Seitz, H. K. and Lieber, C. S. : Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. *Cancer Res.*, **41**, 120 (1981)
8. Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J. and Ookhtens, M. : Glutathione, alcohol and hepatotoxicity. In "*Nutrition and the Origins of Disease*" Halsted, C. H. and Rucker, R. B. (eds.), Academic Press, p.269 (1989)
9. Shaw, S. and Jayatilleke, E. : Acetaldehyde-mediated hepatic lipid peroxidation : Role of superoxide and ferritin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 984 (1987)
10. Ohnishi, K. and Lieber, C. S. : Respective role of superoxide and hydroxy radical in the activity of the reconstituted microsomal ethanol oxidizing system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 798 (1978)
11. 홍영숙, 함윤애, 성낙응 : 알코올을 투여한 흰쥐에서 비타민 E 투여가 lipid peroxidation에 미치는 영향. 이화여대의대지, **7**, 3 (1984)
12. Liber, C. S. : The influence of alcohol on nutritional status. *Nutr. Rev.*, **46**, 241 (1988)
13. Halsted, C. H. : Alcoholism and malnutrition. Introduction to the symposium. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2705 (1980)
14. Leo, M. A., Kim, C. and Lieber, C. S. : Alcohol, vitamin A and zinc. *Nutr. Rev.*, **45**, 253 (1987)
15. Lieber, C. S. and Decarli, L. M. : The feeding of ethanol in liquid diet. *Alcoholism : Clin. Exp. Res.*, **10**, 550 (1986)
16. Lieber, C. S. and Decarli, L. M. : Liquid diet technique of ethanol administration 1989 update. *Alcohol & Alcoholism*, **24**, 197 (1989)
17. Bidlack, W. T. and Tapple, A. L. : Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids*, **8**, 177 (1973)
18. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative charaterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158 (1967)
19. Tappel, A. L. : Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Method in Enzymology*, **52**, 506 (1978)
20. Carlberg, I. and Mannervick, B. : Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, Academic press, p.113 (1985)
21. Habig, W. H. : Glutathione S-transferase. *J. Biol. chem.*, **249**, 7130 (1974)
22. Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide binding pigment of liver microsome. *J. Biol. chem.*, **239**, 2370 (1964)
23. Matsubura, T., Koike, M., Touchi, A., Tochino, Y. and Sugeno, K. : Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal. Biochem.*, **75**, 596 (1976)
24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biochem.*, **193**, 265(1951)
25. Lieber, C. S. and Decarli, L. M. : The feeding of alcohol in Liquid diets : Two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism : Clin. and Exp. Res.*, **6**, 523 (1982)
26. Leo, M. A., Sato, M. and Lieber, C. S. : Effect of hepatic vitamin A depletion on the liver in humans and rats. *Gastroenterology*, **84**, 562 (1983)
27. Sato, M. and Lieber, C. S. : Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *J. Nutr.*, **111**, 2015 (1981)
28. Coon, M. J. : Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs, and carcinogens. *Nutr. Rev.*, **36**, 319 (1978)
29. Fink, R., Marjot, D. H., Cawood, P., Iversen, S. A., Clemens, M. R., Patsalos, P., Norden, A. G. and Dormandy, T. L. : Increased free radical activity in alcoholics. *Lancet*, **2**, 291 (1985)
30. Tanner, A. R., Bantock, I., Hinks, L., Lloyd, B., Turner, N. R. and Wright, R. : Depressed selenium and vitamin E levels in an alcoholic population : Possible relationship to hepatic injury through increased lipid peroxidation. *Dig. Dis. Sci.*, **31**, 1307 (1986)
31. Hashmoto, S. and Recknagel, R. O. : No chemical evidence of hepatic lipid peroxidation in acute ethanol toxicity. *Exp. Molec. Pathol.*, **8**, 225 (1968)
32. Cederbaum, A. I. : Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Rad. Biol. Med.*, **7**, 537 (1989)
33. Rashba-Step, J., Turro, N. J. and Cederbaum, A. I. : ESR studies on the production of reactive oxygen intermediate by rat liver microsomes in the presence of NADPH or NADH. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 391 (1993)
34. 곽춘식, 김여희, 조순승 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관결찰이 간의 glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 활성에 미치는 영향. 한국생화학회, **23**, 251 (1990)
35. 윤은영, 최혜미 : BHT 첨가식이 및 2-AAF 투여가 식이지방을 달리한 쥐 간의 microsomal mixed function oxidase계에 미치는 영향. 한국영양학회지, **23**, 11 (1993)
36. Burk, R. F., Trumble, M. and Alawrence, R. : Rat hepatic cytosolic glutathione-dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH microsomal lipid peroxidation system. *Biochem. Biophys. Acta*, **618**, 35 (1980)
37. Murphy, S. E. and Hecht, S. S. : Effects of chronic ethanol consumption on benzo(a)pyrene metabolism and GST activity in Syrinn golden hamster check pouch and liver. *Cancer Res.*, **46**, 141 (1986)
38. Pickett, C. B. : Glutathione S-transferase : Gene structure, regulation and biological function. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 743 (1989)
39. Smith, G. J., Ohl, V. S. and Litwack, G. : Ligandin, the glutathione S-transferase and chemically induced hepatocarcinogenesis : A review. *Cancer Res.*, **37**, 8 (1977)
40. 유태화 : 알코올 투여가 흰쥐 간조직내 cytochrome 계 및 lipid peroxidation에 미치는 영향. 이화여자대학교 박사학위 논문 (1987)
41. Guengerich, F. P. : Role of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, **48**, 2946 (1988)

42. Benson, A. M., Batzinger, R. P. and Ou, S. Y. : Elevation of hepatic GST activity and protection against mutagenic metabolities of benzo (a)pyrene by dietary antioxidant. *Cancer Res.*, **38**, 4486 (1978)

(1995년 9월 28일 접수)