

## 만성 알코올 섭취시 2-Acetylaminofluorene 투여가 흰쥐 간 미토콘드리아 ATPase 활성도와 막지질 조성에 미치는 영향

류선영 · 김정희<sup>†</sup>

서울여자대학교 영양학과

### Effect of Chronic Alcohol Feeding and 2-Acetylaminofluorene Treatment on Hepatic Mitochondrial ATPase Activity and Membrane Lipid Composition in Rats

Sun-Young Ryu and Jung-Hee Kim<sup>†</sup>

Dept. of Nutrition, Seoul Women's University, Seoul 134-774, Korea

#### Abstract

This study was done to investigate the effect of chronic alcohol feeding and acetylaminofluorene (2-AAF) treatment on hepatic mitochondrial ATPase activity and membrane lipid composition. Male Sprague-Dawley rats, weighing 120~125g, were fed for 6 weeks on a liquid diet containing 35% of calories as ethanol. 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 mitochondrial ATPase activity significantly decreased by ethanol feeding but not by 2-AAF treatment. In comparison to control, the ATPase activity of ethanol-AAF group decreased 29.3%. Since phospholipid (PL) content of mitochondria has an interaction effect between ethanol and 2-AAF treatment, 2-AAF treatment significantly increased phospholipid content in only ethanol fed group. Total cholesterol (C) level of mitochondria significantly increased by ethanol feeding. Consequently C/PL ratio of ethanol group was significantly higher than that of control group. The analysis of mitochondrial PL composition showed that cardiolipin (CL) significantly increased by 2-AAF treatment in control group. Phosphatidyl choline (PC) significantly increased by ethanol feeding, whereas PC significantly decreased and phosphatidyl ethanolamine (PE) significantly increased by 2-AAF treatment. 2-AAF treatment also showed a significant increase in PE/PC ratio. Fatty acid patterns of mitochondria were also changed by either ethanol or 2-AAF although the severity of the changes was not great. These data suggest that the reduced mitochondrial ATPase activity in ethanol-AAF group may be a consequence of a changes in mitochondrial membrane lipid composition such as PE/PC ratio, C/PL ratio and fatty acid patterns.

**Key words** : ethanol, 2-AAF, ATPase, mitochondrial lipids

#### 서 론

알코올이 인체에 미치는 영향에 대해서는 오래 전 부터 많은 학자들에 의해 보고되고 있으며 그 중 가장 흔한 현상은 알코올을 과량을 섭취하거나 만성적으로 섭취시 간조직의 구조 및 기능에 치명적인 손상을 가져오는 것이다(1,2). 즉 장기간의 알코올 섭취는 간조직의 지방대사의 이상을 초래하여 지방산의 산화를 감소시

키고 지방산의 합성을 증가시킴에 따라 중성지질의 축적이 일어나고(3,4) 또한 아세트알데하이드의 독성 효과에 의해 microtubule의 손상이 일어나 결국 지방간이 유발되고 심하면 알코올성 간염이나 간경화증을 일으킬 수 있다(5). 그 외에도 만성적인 알코올 섭취는 알코올 산화시 대사작용이 촉진되어서 산소 소비량의 증가에 따라 간조직의 부분적인 저산소증과 괴사를 초래하거나 또는 알코올 대사시 생성되는 유리 래디칼에 의해 지질과산화물의 반응이 촉진되어 간조직이 손상될 수도 있다(6,7).

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

또한 알코올은 약한 마취제로 알려져 있으며 고농도의 알코올을 섭취시 생체막 구조상에 손상을 일으킨다(8). 즉, 알코올은 생체막의 지질 이중막에 주로 작용하며 만성적으로 섭취시 막지질 조성의 변화로 인해 지질 이중막의 물리적 성질의 변화가 초래되어 알코올에 대한 cellular adaptation이 일어나거나 막 인지질의 변경으로 지질과 단백질의 상호작용에 민감한 영향을 주어 막 부착효소 활성도의 변화를 초래하기도 한다(9,10). 특히 여러 연구에서 만성적으로 알코올을 섭취시 간 미토콘드리아의 구조적 손상(11)과 기능적 이상(12,13)이 두드러지게 나타났고 respiration과 ATPase 활성이 낮아졌으며(14,15) 이러한 변화는 막 인지질 변화와 서로 연관성이 있는 것으로 보고 있다.

2-acetylaminofluorene (2-AAF)은 간암을 유발하는 발암물질로 간에서 cytochrome P-450 system에 의해 활성화되어 궁극적인 발암물질로서 작용한다(16). 그러나 알코올은 체내에서 직접 암의 개시인자로 작용한다는 결정적인 증거는 없으나 조직의 국소적 손상을 일으키고, 세포막의 투과성에 변화를 일으켜 발암원의 흡수를 증가시킬 수 있으며 특히 만성적인 알코올 섭취시는 2-AAF 같은 발암물질의 대사적 활성화를 촉진하여 간암 유도를 촉진할 수 있다고 한다(17,18).

따라서 본 연구에서는 액체식을 사용하여 만성적인 과량의 알코올 섭취가 간 미토콘드리아 막부착 효소인 ATPase 활성과 지질 조성에 미치는 영향에 대해 알아보고 아울러 간암의 발암원으로 알려진 2-AAF를 투여하여 미토콘드리아의 지질 조성과 ATPase 활성에 미치는 상호 효과를 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 식이

이유한 Sprague-Dawley종 숫쥐 120~125g된 것을 일정한 조건에서 고형식으로 6일간 사육한 후 난피법에 따라 알코올군과 대조군으로 나누어 액체식으로 6주간 사육하였다. 식이 조성은 Lieber와 DeCarli의 액체식이(19)를 약간 변형하여 사용하였으며 Table 1에 나타내었다. 액체식에 포함된 열량은 대조군 (protein : fat : carbohydrate : ethanol=180.0 : 150.0 : 670.0 : -)과 알코올군 (protein : fat : carbohydrate : ethanol=180.0 : 150.0 : 320.0 : 350.0)으로 나누어 1 liter당 1000kcal가 되도록 하였다. 알코올군에서의 알코올 함량은 총 열량의 35%가 되도록 공급하였다. 식이 섭취는 pair-feeding으로 하였으며 대조군의 공급량은 알코올군의 섭취량

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

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 <sup>1)</sup>	12.7	12.7
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	1.0	1.0
Xanthan gum	2.5	2.5
Total	243.5	204.4

<sup>1)</sup>Composition of salt mixture (g/L, 1000kcal) : Calcium lactate 5g, NaCl 1.02g, KCl 1.09g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.85g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.38g, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.04g, KI 0.008g, Ferric citrate 0.29g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.044g, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.15g, Zinc carbonate 0.06g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.0001g, CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.005g

<sup>2)</sup>Vitamin mixture (mg/L of diet, 1000kcal) : Thiamin hydrochloride 1.5mg, Riboflavin 1.5mg, Pyridoxine hydrochloride 1.75mg, 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<sub>12</sub> 1.75mg, Folic acid 0.5mg, Vitamin A retinyl acetate (1500 IU/mg)-3.68mg, Ergocalciferol 0.17mg, α-tocopherol (198IU/g)-260mg, Ascorbic acid 10mg and dextrose to make 1g

에 맞추어 공급하였다.

### 2-AAF 투여

실험식으로 공급을 시작한지 4주 지난 후 알코올군과 대조군을 다시 두 군씩 나누어 발암 물질인 2-AAF를 3일 간격으로 2회 복강 투여하였다. 1회 투여량은 polyethyleneglycol 300에 녹인 2-AAF를 체중 kg당 100 mg 수준으로 하였으며, 2-AAF를 투여하지 않은 다른 한군에도 2-AAF를 녹이지 않은 매체 polyethyleneglycol 300을 체중 kg당 1.5ml 수준으로 투여하였고 12시간 금식시킨 후 2-AAF를 투여하였다.

### 미토콘드리아 분리

12시간 금식시킨 후 개복하여 간을 절제하여 무게 측정 후 일정량의 간을 취하여 buffer (0.25M sucrose, 50 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 7.4, at 4°C) 용액으로 균질액을 만든 후 Johnson과 Lardy의 방법(20)으로 미토콘드리아를 얻었다.

### 미토콘드리아 ATPase 활성도 측정

ATPase 활성도 측정은 시료의 단백질 농도가 약 0.025 mg이 되도록 50mM MES-HCl buffer (pH 6, 0.1mM EDTA 포함) 용액으로 희석시킨 다음 Katz 등(21)과 Lowry

(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 단백질 함량은 Lowry 등 (23)의 방법으로 측정하였고 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

미토콘드리아 지질조성 분석

미토콘드리아에서 Bligh와 Dyer의 방법 (24)으로 추출한 지질의 콜레스테롤 함량은 Allain 등의 방법 (25)을 수정하여 측정하였다. 총 인지질 함량은 phosphorus 함량을 측정하는 Rouser 등의 방법 (26)으로 측정하였다. 표준용액으로 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하여 표준곡선을 그렸다.

미토콘드리아의 인지질 조성은 Patton 등 (27)의 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 방법에 의하여 분석하였다. [column ; 10μ LiChrospher Si-100 Hibar II column, eluting solvent ; 2-propanol : 25mM potassium phosphate (pH 7.0) : hexane : absolute ethanol=490 : 62 : 367 : 100, flow rate ; 1.5ml/min, 203nm]. 지방산 조성은 BF<sub>3</sub>-methanol을 사용하여 trans-methylation시켜 측정된 Metcalfe 등의 방법 (28)을 사용하여 Hewlette Packard 5890A Gas Chromatography (GC)로 분석하였다. [column : 100/200mesh chromosorb WHP 2% Silar 5 CP (Supelco, Inc), detector : flame ionization detector, 초기 온도 : 174° C로 5분간 유지, 최종 온도 : 245° C 까지 분당 12° C씩 상승, 주입구 온도 : 250° C, 검출기 온도 : 300° C, carrier gas : 질소, flow rate : 9.8ml/min] 각 지방산 함량은 자동 면적 적분기에서 면적 %로 구하였고 각 지방산의 확인은 표준지방산 methyl ester와 retention time을 비교하여 이루어졌다.

통계처리

통계처리는 SAS program을 이용하였으며 모든 실험 결과는 평균치와 표준오차로 표시하였으며, 알코올 섭취와 2-AAF 투여의 상호작용을 검증하기 위해 2-way ANOVA로 분석하였고 각 군의 평균치간의 비교는 Least Significant Difference (LSD) technique을 이용하여 p < 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

식이섭취량 및 식이효율의 변화

식이 섭취량을 pair-feeding을 하였으나 알코올 투여 시 유의적 (p < 0.0001)인 감소를 보였고, 따라서 이런 결과는 다량의 알코올을 만성적으로 섭취한 환자를 대상으로 한 실험에서 알코올 섭취시 식이 섭취량의 감소와 여러 영양소의 흡수 장애로 체중 감소를 초래한다는 보고 (29)와 일치하였다. 따라서 알코올군의 체중 감소는 식이 섭취량의 감소 뿐만 아니라 알코올 자체의 독성 효과로 인해 소화율을 감소시키고 영양소의 흡수 장애를 초래하였으며 또한 식이 효율의 감소에도 기인하는 것으로 보인다.

체중은 알코올 섭취에 의해 유의적인 감소 (p < 0.0001)를 보였다. 그러나 2-AAF 투여에 의한 효과는 나타나지 않았으며, 알코올 섭취와 함께 2-AAF를 투여한 군 (EA)에서 가장 적게 나타났다 (Table 2).

미토콘드리아 ATPase 활성도 변화

미토콘드리아의 ATPase 활성도 변화는 Table 3에 나타내었다. Two-way ANOVA 분석시 ATPase 활성도를 유의적 (p < 0.0167)으로 감소시켰으며 2-AAF에 의한 유의적인 효과는 나타나지 않았다. 따라서 각 군별 비교에서 대조군 (C)에 비하여 알코올 섭취와 함께 2-AAF를 투여한 군 (EA)에서 ATPase 활성도가 29.3%의 유의

Table 3. Effect of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on hepatic mitochondrial ATPase activities in rats<sup>1)</sup>

Group	ATPase activity (nmol / mg Protein / min)
Control (C)	185.5 ± 9.2 <sup>b</sup>
Control-AAF (CA)	162.4 ± 19.7 <sup>ab</sup>
Ethanol (E)	149.6 ± 4.8 <sup>ab</sup>
Ethanol-AAF (EA)	131.2 ± 9.1 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean ± S.E. (n=6)

<sup>ab</sup> 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 ATPase was significant at p < 0.0167

Table 2. Effects of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on weight gain, food intake and food efficiency ratio<sup>1)</sup>

Group	Body weight (g / day)	Food intake (g / day)	Food efficiency ratio
Control (C)	225.8 ± 4.7 <sup>b</sup>	72.05 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>b</sup>
Control-AAF (CA)	227.3 ± 4.6 <sup>b</sup>	71.70 ± 0.28 <sup>b</sup>	0.010 ± 0.002 <sup>b</sup>
Ethanol (E)	175.4 ± 9.1 <sup>a</sup>	63.60 ± 0.98 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.004 <sup>ab</sup>
Ethanol-AAF (EA)	161.0 ± 10.4 <sup>a</sup>	61.79 ± 1.26 <sup>a</sup>	-0.0003 ± 0.003 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean ± S.E. (n=8)

<sup>ab</sup> 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, food intake and food efficiency ratio was significant at p < 0.0001, p < 0.0001 and p < 0.0137, respectively

적 ( $p < 0.05$ )인 감소를 나타내었다.

Cederbaum 등(12)에 의하면 대조군과 비교하여 알코올군의 미토콘드리아내  $Mg^{2+}$ -stimulated or uncoupler-stimulated ATPase 활성도는 유의적인 차이는 나타내지 않은 반면에  $Ca^{2+}$ -stimulated ATPase 활성도는 현저히 감소하였다. 이것은 알코올 섭취에 의해  $Ca^{2+}$  uptake가 감소된 것임을 나타낸다고 한다. 미토콘드리아의 주기능인 호흡계와 에너지 생성 기능에 있어 부분적으로 알코올 대사로 생성되는 acetaldehyde와 만성적인 알코올 섭취로 나타나는 독성효과로 저해되며 특히 NADH-ubiquinone oxidoreductase, oxidative phosphorylation과 ATP-P 교환률 등이 저해됨에 따라 미토콘드리아 기능에 많은 손상을 초래하였다고 한다. Lee(30)는 만성적 알코올 섭취가 간 미토콘드리아 ATPase 활성과 respiration을 감소시키는 원인을 막 인지질에 미치는 알코올의 "fluidizing" 효과로 인한 결과라고 보고하였다. 본 실험 결과에서도 알코올군에서 ATPase 활성도가 유의적으로 낮게 나타났는데 이는 알코올 섭취로 인한 막지질 조성의 변화에 의해 미토콘드리아 막부착 효소인 ATPase 활성의 저하를 가져온 것이라고 사료된다.

#### 미토콘드리아 지질조성 변화

미토콘드리아의 콜레스테롤 및 인지질량은 Table 4에 나타내었다. 미토콘드리아의 콜레스테롤 함량은 알코올 섭취로 인해 유의적 ( $p < 0.0055$ )으로 높게 나타났으며, 2-AAF에 의한 효과는 보이지 않았다. 그러나 각 군별 비교에서 보면 알코올 섭취와 함께 2-AAF를 투여한 군(EA)에서는 콜레스테롤 함량이 대조군에 비해 30.2%의 유의적인 증가를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 인지질 함량은 알코올이나 2-AAF 각각에 의한 효과는 없었으나 이들 두 요인에 의한 상호 효과에 유의성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 알코올 비투여군에서는 2-AAF에 의한 증가 효과가 없으나 알코올 투여군에서는 2-AAF 투

여에 의한 유의적인 인지질량의 증가 효과가 나타났다. Arai 등(31)은 baboon에게 총 열량의 50%를 알코올로 투여시 미토콘드리아의 총 인지질량이 유의적으로 감소하였다고 하며, 이는 PC와 CL의 감소에 기인한 것이라고 설명하였다. 그러나 Cunningham(32)에 의하면 총 열량의 36%를 알코올로 투여시 간 미토콘드리아내 총 인지질 함량에는 유의적인 차이가 없었다고 보고하였고, Gordon 등(33)도 이와 비슷한 보고를 하였으며 따라서 실험 디자인에 따라 약간씩 다른 결과를 보여준다. 생체 인지질 막의 유동성에 관한 지표를 나타내는 좋은 수치로서 이용되는 콜레스테롤과 인지질(C/PL) 몰비를 측정할 결과 알코올이나 2-AAF에 의한 유의적인 효과는 나타나지 않았으나 평균치간의 비교에서 알코올군이 대조군 보다 유의적으로 증가하였다. 이는 알코올군에서의 콜레스테롤량 증가에 기인한 것이라 생각된다. 본 실험 결과에서 미토콘드리아 콜레스테롤 함량의 증가시에 ATPase 활성도가 감소되는 유의적인 역의 상관관계 (correlation coefficient = -0.59,  $p < 0.0077$ )를 관찰하였다.

HPLC로 측정할 간 미토콘드리아의 인지질 조성 (Table 5)에서 보면 알코올 섭취에 의해 CL량은 약간의 감소 경향을 나타냈으나 유의적이지는 않았고, PS와 PI량은 차이가 없었다. 알코올 섭취로 PC량은 유의적 ( $p < 0.0479$ )으로 증가하였으나 PE량은 유의적인 차이가 없었으며, 2-AAF 투여에 의해서는 PC량은 유의적인 ( $p < 0.0347$ ) 감소를 보였으나 PE량은 유의적 ( $p < 0.0372$ )으로 증가하였다. PE/PC 비율은 알코올 투여에 의해 유의성은 없었으나 감소 경향을 나타냈으며, 2-AAF 투여에 의해서는 유의적 ( $p < 0.0318$ )인 증가 효과가 나타났다. Cunningham 등(32)의 실험에서는 알코올 섭취로 미토콘드리아 인지질 조성에는 유의적인 차이를 나타내지는 않았고 microsome의 인지질 중 PI만이 유의적으로 증가하였고, CL은 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 알

Table 4. Effect of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on hepatic mitochondrial cholesterol and phospholipid contents in rats<sup>a)</sup>

Group	Cholesterol (nmol/mg Protein)	Phospholipid-Pi (nmol/mg Protein)	C/PL-Pi (molar ratio)
Control (C)	18.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	760.58 ± 46.77 <sup>ab</sup>	0.024 ± 0.001 <sup>a</sup>
Control-AAF (CA)	17.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	668.33 ± 61.61 <sup>a</sup>	0.025 ± 0.003 <sup>a</sup>
Ethanol (E)	21.4 ± 1.9 <sup>ab</sup>	614.12 ± 90.33 <sup>a</sup>	0.038 ± 0.005 <sup>a</sup>
Ethanol-AAF (EA)	23.7 ± 1.8 <sup>b</sup>	836.27 ± 49.19 <sup>b</sup>	0.028 ± 0.003 <sup>ab</sup>

<sup>a)</sup>Values are mean ± S.E. (n=6)

<sup>ab</sup>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 cholesterol was significant at  $p < 0.0055$  and phospholipid has an interaction effect between ethanol and 2-AAF treatment at  $p < 0.0399$

코올군에서 약간 감소하는 경향을 보였으며, PC는 약간 증가하는 경향을 보였다. 그러나 Arai 등(31)에 의하면 미토콘드리아에만 특징적으로 존재하는 CL과 PC는 알코올 섭취시 감소하였다고 보고하였다. PE/PC 비율은 막 부착 효소의 활성도를 변화시키는 또 다른 지표로서 사용되고 있다. Lee와 Kim(34)의 연구에서는 PE의 조성비와 ATPase 활성도 사이에 유의적인 정적 상관관계가 있음을 보여주었으나 본 실험에서는 유의적인 상관관계를 나타내지 않았다.

미토콘드리아 지방산조성 변화(Table 6)에서는 대조군과 비교하였을 때 알코올 섭취군에서는 palmitic acid(C16 : 0)는 유의적으로 감소하였고 stearic acid(C18 : 0)는 유의적으로 증가하였다. Saturated fatty acid(SFA)와 monounsaturated fatty acid(MUFA)는 대조군 보다 알코

올군에서 다소 낮게 나타났으나 유의성은 없었다. UFA/SFA는 대조군 보다 알코올군에서 다소의 증가를 보였고 UI(unsaturation index)값도 알코올군이 증가를 나타냈으나 유의적이지는 않았다. 2-AAF 투여 역시 linoleic acid 함량을 감소시키는 경향이 있었고 arachidonic acid의 함량을 증가시키는 경향을 보임에 따라 UI값이 증가하는 경향이 있었다. Gordon 등(33)에 의하면 알코올 섭취 후 간 미토콘드리아막의 지방산 조성 중 palmitic acid는 유의적으로 감소하는 반면에 stearic acid는 유의적으로 증가하였고 SFA와 UFA의 비율은 유의적인 차이가 없었다고 보고하였으며 이는 본 실험결과와 일치한다. 그러나 Arai 등(31)은 알코올 섭취로 stearic acid와 linoleic acid(C18 : 2)가 유의적으로 증가하였고 arachidonic acid(C20 : 4)는 유의적으로 감소하였으며 또

**Table 5. Effect of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on hepatic mitochondrial phospholipid composition in rats<sup>1)</sup>**

Group \ PL (%)	PS	PI	CL	PE	PC	PE/PC ratio
Control (C)	0.29±0.14 <sup>ns</sup>	8.78±1.33 <sup>ns</sup>	6.76±2.64 <sup>a</sup>	40.35±1.09 <sup>ab</sup>	43.85±5.21 <sup>ab</sup>	0.94±0.14 <sup>ab</sup>
Control-AAF (CA)	0.12±0.07	8.98±0.63	9.31±0.37 <sup>b</sup>	43.06±1.03 <sup>b</sup>	38.53±1.26 <sup>a</sup>	1.13±0.07 <sup>b</sup>
Ethanol (E)	0.57±0.37	7.41±0.08	6.36±0.66 <sup>a</sup>	39.69±0.69 <sup>a</sup>	45.97±0.39 <sup>b</sup>	0.86±0.01 <sup>a</sup>
Ethanol-AAF (EA)	0.46±0.14	8.26±0.59	6.39±1.03 <sup>b</sup>	42.01±0.99 <sup>ab</sup>	42.88±1.29 <sup>ab</sup>	0.98±0.04 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±S.E. (n=5)

<sup>ab</sup>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 PC was significant at p<0.0479 and 2-AAF effect for PE, PC and PE/PC ratio was significant at p<0.0372, p<0.0347 and p<0.0318, respectively. Abbreviations : PS=phosphatidyl serine, PI=phosphatidyl inositol, CL=cadiolipin, PE=phosphatidyl ethanolamine, PC=phosphatidyl choline

**Table 6. Effect of chronic alcohol feeding and 2-AAF treatment on hepatic mitochondrial fatty acid composition in rats<sup>1)</sup>**

Fatty acid (%)	Control	Control-AAF	Ethanol	Ethanol-AAF
16 : 0	21.4±2.5 <sup>c</sup>	19.3±1.4 <sup>bc</sup>	15.5±0.5 <sup>ab</sup>	15.0±0.9 <sup>a</sup>
16 : 1	1.2±0.1 <sup>f</sup>	1.0±0.1 <sup>bc</sup>	0.8±0.1 <sup>ab</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>
18 : 0	19.8±0.7 <sup>a</sup>	20.1±0.1 <sup>a</sup>	23.8±1.1 <sup>b</sup>	26.4±1.3 <sup>b</sup>
18 : 1	9.3±0.9	9.1±0.8	9.2±0.8	8.4±0.7
18 : 2	22.0±1.4	21.8±1.2	23.1±0.4	21.6±0.9
20 : 0	0.4±0.2	0.4±0.3	0.7±0.3	0.4±0.2
20 : 1	0.8±0.3 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>ab</sup>	0.3±0.1 <sup>ab</sup>
20 : 2	0.8±0.5	0.9±0.5	0.6±0.2	0.6±0.2
20 : 4	22.7±3.8	25.8±2.9	22.7±1.0	24.2±1.0
22 : 2-3	1.4±0.2 <sup>ab</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>	2.7±0.4 <sup>c</sup>	1.9±0.3 <sup>b</sup>
22 : 6	0.6±0.1 <sup>ab</sup>	0.2±0.0 <sup>a</sup>	0.8±0.2 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>b</sup>
SFA (%)	41.6	39.8	40.0	41.8
MUFA (%)	11.3	10.3	10.3	9.4
PUFA (%)	47.5	49.7	49.9	49.2
UFA/SFA	1.41	1.51	1.51	1.40
MCL	17.5	17.6	17.4	17.7
UI	1.49	1.58	1.52	1.55
n-6	44.7	47.6	45.8	45.8
n-3	0.6	0.2	0.8	0.9

<sup>1)</sup>Values are mean±S.E.(n=5)

<sup>abc</sup>Means with the same superscripts within a row are not significantly different at p<0.05 by LSD test

Expressed as % distribution of fatty acid methyl esters

SFA=saturated fatty acid MCL=mean chain length MUFA=monounsaturated fatty acid UI=unsaturation index

PUFA=polynsaturated fatty acid

한 PUFA가 유의적으로 감소하였다고 하였다. Miceli과 Ferrell (35)은 또한 만성적으로 알코올을 섭취시킨 쥐 간 미토콘드리아의 불포화지방산(16 : 1, 18 : 1, 18 : 2, 20 : 4, 22 : 6)은 감소하였으며 포화지방산인 stearic acid는 유의적으로 증가하였다고 한다. 막 지방산 saturation 변화는 막 유동성의 변화(36) 또는 이중 지질막의 hydrocarbon core의 orderness와 활동에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 생체막은 여러가지 지방산의 조성의 변화에 의해 막유동성 등 막의 여러가지 물리적 성질이 변하여 ATPase (37), adenosine nucleotide exchange (38) 같은 막 부착 효소의 활성도가 영향을 받는다.

이상의 결과에서 과량의 알코올을 만성적으로 투여시 미토콘드리아의 ATPase 활성도가 감소되었으나 발암물질의 단독 부어만으로는 그 활성도에 유의적인 변화를 주지 못했다. 그러나 알코올 섭취와 2-AAF 투여가 동시에 이루어졌을 때 미토콘드리아의 지질 조성 변화 및 ATPase 활성도 감소가 가장 두드러지게 나타나 미토콘드리아의 에너지 생성기능에 이상을 가져오는 것으로 추론된다. 본 실험에서 나타난 ATPase 활성도 감소는 미토콘드리아 막지질 조성의 변화 즉, 콜레스테롤의 변화와 인지질 조성과 C/PL 비율 변화 그리고 지방산 변화 등에 기인하는 것으로 생각된다.

## 요 약

만성적인 알코올 섭취가 미토콘드리아의 지질조성 및 ATPase 활성도에 미치는 영향을 조사하고 아울러 간의 발암물질인 2-AAF를 투여하여 간 미토콘드리아의 기능에 미치는 상호 효과를 조사하기 위하여 120~125g 섭취에게 열량의 35%를 알코올로 공급하여 6주간 사육하였으며 알코올 섭취 4주 후에 2-AAF를 3일 간격으로 2회 복강투여하여 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다. 1. 체중 증가, 식이 섭취량 및 식이효율에 대한 알코올의 효과는 유의적인 차이를 보였으나, 2-AAF에 의한 유의적인 효과는 관찰할 수 없었다. 알코올 섭취군이 대조군 보다 체중은 유의적으로 감소하였다. 2. 미토콘드리아 ATPase 활성도는 알코올 섭취에 의해 유의적으로 감소되었고, 2-AAF 투여에 의해서는 유의적이지는 않으나 감소되는 경향을 보였다. 따라서 대조군(C)에 비하여 알코올 섭취와 2-AAF투여군(EA)에서 ATPase 활성도가 29.3%의 감소를 나타냈다. 3. 간 미토콘드리아 콜레스테롤 함량은 알코올 섭취에 의해 유의적으로 증가하였으며 미토콘드리아 총 인지질량은 알코올과 2-AAF에 의한 상호작용에 의해 알코올 투여군에서만 2-

AAF 투여시 유의적인 증가 효과를 보여주었다. C/PL 비율은 알코올 섭취와 2-AAF 투여 모두에서 유의적인 효과는 보이지 않았으나 군간 비교시 알코올군(E)이 대조군(C) 보다 유의적으로 증가하였다. 4. 간 미토콘드리아의 CL량은 알코올군에서 감소하는 경향을 보였고 PS와 PI량은 차이가 없었다. 알코올 섭취로 PC량은 유의적으로 증가하였으나 PE량은 차이가 없었으며, 2-AAF 투여시 PC량은 유의적인 감소를 보였고 PE량은 유의적으로 증가하였다. PE/PC 비율은 알코올 투여에 의해 유의성은 없었으나 감소경향을 나타냈으며, 2-AAF 투여에 의해서는 유의적인 증가 효과가 나타났다. 5. 알코올 섭취시 미토콘드리아의 지방산 조성은 palmitic acid가 유의적으로 감소하였고, stearic acid는 유의적으로 증가함을 보였다. UFA/SFA와 UI는 알코올군에서 유의적이지는 않으나 증가되는 경향을 보였다. 2-AAF 투여에 의해서도 linoleic acid는 감소되고 arachidonic acid는 증가되는 경향을 보여 UI값이 증가되는 경향이 있었다. 따라서 본 실험에서 나타난 ATPase 활성도 변화는 미토콘드리아의 콜레스테롤변화, C/PL 비율, 인지질 조성이나 지방산 조성의 변화 등 막지질 조성의 변화에 기인하는 것으로 생각된다.

## 문 헌

- 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)
- Tsukamoto, H. and Towner, S. J. : Ethanol induced liver fibrosis in rats fed high fat diets. *Hepatology*, **6**, 814 (1984)
- Lieber, C. S. : Alcohol and the liver : 1994 update. *Gastroenterology*, **106**, 1085 (1994)
- Lieber, C. S. and Schmid, R. : The effect of ethanol on fatty acid metabolism : Stimulation of hepatic fatty acid synthesis *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **40**, 394 (1961)
- Lieber, C. S., Garro, A., Leo, M. A., Mak, K. M. and Wornor, T. : Alcohol and cancer. *Hepatology*, **6**, 1005 (1986)
- 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)
- Shaw, S. and Jayatilke, E. : Acetaldehyde-mediated hepatic lipid peroxidation : Role of superoxide and ferritin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 984 (1987)
- Seeman, P. : The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.*, **24**, 583 (1972)
- Kim, C. I., Leo, M. A., Lowe, N. and Lieber, C. S. : Differential effects of retinoids and chronic ethanol consumption on membranes in rats. *J. Nutr.*, **118**, 1097 (1988)

10. Michaeli, E. K. and Michael, M. L. : Physico-chemical interactions between alcohol and biological membranes. In "Research advances in alcohol and drug problem" Smart, R. G., Glaser, H., Israel, Y., Kalant, J. M., Popham, A. and Schmidt, A. (eds.), Plenum Publishing, Vol. 7, p. 127(1983)
11. Porta, E. A., Hartroft, W. S. and de la Iglesia, F. A. : Hepatic changes associated with chronic alcoholism in rats. *Lab. Invest.*, **14**, 1437(1965)
12. Cederbaum, A. I., Lieber, C. S. and Rubin, E. : Effect of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions : Damage to coupling site I. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 560(1974)
13. Thayer, W. S. and Rubin, E. : Effects of chronic ethanol intoxication on the respiratory chain of rat liver sub-mitochondrial particles. *J. Biol. Chem.*, **254**, 7717(1979)
14. Rottenburg, H., Robertson, D. and Rubin, E. : The effect of ethanol on the temperature dependence of respiration and ATPase activities of rats liver mitochondria. *Lab. Invest.*, **42**, 318(1980)
15. Hosein, E. A., Hofmann, I. and Linder, E. : The influence of chronic ethanol feeding to rats on the integrity of liver mitochondrial membrane as assessed with the  $Mg^{2+}$ -stimulated ATPase enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 64(1977)
16. Heidelberger, C. : Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 79(1975)
17. Seitz, H. K. and Simanowski, U. A. : Ethanol and carcinogenesis of the alimentary tract. *Alcoholism : Clin. Exp. Res.*, **10**, 33s(1986)
18. Coon, M. J. : Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens. *Nutr. Rev.*, **36**, 319(1978)
19. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : Liquid diet technique of ethanol administration 1989 update. *Alcohol & Alcoholism*, **24**, 197(1989)
20. Johnson, D. and Lardy, H. : Isolation of liver and kidney mitochondria. *Methods in enzymology*, Estabrook, R. W. and Pullman, M. E. (eds.), Academic Press, Vol. 10, p.94(1967)
21. Katz, D. B., Sussman, M. R., Mierzwa, R. J. and Evert, R. F. : Cytochemical localization of ATPase activity in roots. *Plant. Physiol.*, **86**, 814(1988)
22. Lowry, O. H. : *Methods in enzymology*, Sidney, P. C. and Nathan, O. (eds.), Academic Press, New York, **4**, 371(1957)
23. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
24. Bligh, E. G. and Dyer, N. J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.*, **37**, 911(1959)
25. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C. : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470(1974)
26. Rouser, G., Fleischer, S. and Yamamoto, A. : Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus. *Lipids*, **5**, 494(1969)
27. Patton, G. M., Fasulo, J. M. and Robins, S. J. : Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid. Res.*, **23**, 190(1982)
28. Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. : Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **38**, 514(1966)
29. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : The feeding of alcohol in liquid diets : Two decade of applications and 1982 update. *Alcoholism : Clin & Exp. Res.*, **6**, 523(1982)
30. Lee, A. G. : Interactions between anesthetics and lipid mixtures. Normal alcohols. *Biochemistry*, **15**, 2448(1976)
31. Arai, M., Gordon, E. R. and Leber, C. S. : Decreased cytochrome oxidase activity in hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption and the possible role of decreased cytochrome a-3 content and changes in phospholipids. *Biochem. Biophys. Acta*, **797**, 320(1984)
32. Cunningham, C. C., Filus, S., Bottenus, R. E. and Spach, P. I. : Ethanol consumption on the phospholipid composition of rat liver microsomes and mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, **712**, 225(1982)
33. Gordon, E. R., Arai, M. and Lieber, C. S. : Lack of correlation between hepatic mitochondrial membrane structure and functions in ethanol-fed rats. *Science*, **216**, 1319(1982)
34. Lee, M. S. and Kim, J. H. : Effects of different dietary oils in hepatic mitochondria lipid composition, adenosine nucleotide translocase and ATPase activities in carcinogen treated rats. *Korean J. Nutr.*, **26**, 532(1993)
35. Miceli, J. N. and Ferrell, W. J. : Effects of ethanol on membrane lipids. III. Quantitative changes in lipid and fatty acid composition of nonpolar and polar lipids of mouse total liver mitochondria and microsome following ethanol feeding. *Lipids*, **8**, 722(1973)
36. Kim, C. I., Leo, M. A., Lowe, N. and Lieber, C. S. : Effects of vitamin A and ethanol on liver plasma membrane fluidity. *Hepatology*, **8**, 735(1988)
37. Robblee, N. M. and Clandinin, M. T. : Effect of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial ATPase activity. *J. Nutr.*, **114**, 263(1984)
38. Kim, J. H., Woldgiorgis, G., Elson, C. E. and Shrago, E. : Age-related changes in respiration coupled to phosphorylation. I. Hepatic mitochondria. *Mech. Aging Rev.*, **46**, 263(1988)

(1995년 9월 28일 접수)