

# Ethanol이 Trichloroethylene 대사효소의 활성도와 유도성에 미치는 영향

김기웅<sup>1</sup> · 강성규<sup>1</sup> · 조영숙<sup>1</sup> · 이세휘<sup>1</sup> · 문영한<sup>1</sup>, 최병순<sup>2</sup>, 박상신<sup>3</sup>

한국산업안전공단 산업보건연구원<sup>1</sup>, 동국대학교 의과대학<sup>2</sup>, 미국국립암연구소<sup>3</sup>

- Abstract -

## Effects of Ethanol on the Activities and Inducibility of Trichloroethylene Metabolic Enzyme System in Rat Liver

Ki Woong Kim<sup>1</sup> · Seung Kyu Kang<sup>1</sup> · Young Sook Cho<sup>1</sup> · Sei Hui Lee<sup>1</sup>  
Young Hahn Moon<sup>1</sup> · Byung Soon Choi<sup>2</sup>, Sang Shin Park<sup>3</sup>

Industrial Health Research institute, KISCO<sup>1</sup>

College of Medicine, Dongguk University<sup>2</sup>

National Cancer Institute, Laboratory of Comparative Carcinogenesis<sup>3</sup>

This study was performed to find out the influences of ethanol on the metabolism of trichloroethylene(TRI) in rats. TRI in corn oil at the dosage of 150, 300, 600 mg/kg was injected peritoneally once a day for two days to two groups. In one group ethanol(4 g/kg) was taken orally 30 minutes before TRI injection, and the other group ethanol was not. The results of experiments are as follows:

1. The contents of cytochrome P-450 and b<sub>5</sub> had inverse relationship with injected TRI amounts in both groups.

2. The activity of NADPH P-450 reductase was decreased slowly in TRI injected group related with TRI amount, but decreased drastically in the group pretreated with ethanol.
3. The activity of NADH b<sub>5</sub> reductase had relationship with injected TRI amount, but the statistical significance was found only in the groups of 300 and 600 mg/kg of TRI injected without relevance to ethanol when compared with the group that was not injected.
4. The activity of ADH was more decreased and ALDH activity was more increased in groups that TRI injected and ethanol was pretreated with ethanol groups than in group without any treatment.

These results suggest that ethanol may inhibit epoxide formulation, the first step of TRI metabolism, and change from TCE-OH to TCA also.

*Key Words: Trichloroethylene, Ethanol, Cytochrome P-450 Monooxygenase*

## 서 론

ethanol은 인류의 역사와 더불어 인간의 기호음료로 널리 응용되어 왔다. ethanol은 체내 생체합성 물질의 생성 및 분해과정에 많은 영향을 초래하는 것으로 동물 및 사람을 통한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 지방산의 합성 촉진, krebs cycle의 활성화, 지방산의 산화감소 등 당의 생성 및 분해과정과 관련된 영향이 큰 것으로 알려졌다(Ritchie, 1980; Ellenborn과 Baeceloux, 1988), 혈액의 fibrinolysis와 혈액응고(Olsen과 Osterud, 1987), 과량의 ethanol에 급성폭포시 간장, 신장, 뇌에 있어서 ascorbic acid의 함량이 감소한다는(Shugalei 등, 1986) 등의 생체합성물질에 대한 연구가 여러 분야에서 이루어졌다.

체내 흡수된 ethanol은 전신에 고루 분포되며; 흡수된 알코올의 90% 이상이 흡수 후 24시간 이내에 산화되는데(Ritchie, 1980), 이중 약 10%가 신장이나 폐를 통하여 배설되고 나머지는 간에 있는 특정한 효소들에 의해서 체계적인 계통에 의한 대사가 이루어지기 때

문에 체내의 기타 장기에 비하여 간장에 미치는 영향은 매우 크다고 볼 수 있다(Goodman과 Gilman, 1975). 간에서 ethanol 대사에 관여하는 효소는 소포체 내 알코올 산화계(microsomal ethanol oxidizing system : MEOS)와 세포질 내 alcohol dehydrogenase(ADH), catalase-peroxide(CP)계 등 크게 세 부분으로 구분할 수 있으며 (Lieber와 Decarli, 1970; Orme-Johnson과 Ziegler, 1965), 그러한 ethanol 대사 효소계 중 ADH에 의한 효소계의 산화작용이 주로 이루어진다고 알려졌다(Lieber, 1985).

ethanol의 대사과정을 보면, 먼저 체내로 흡수된 ethanol을 ADH가 acetaldehyde로 일차 변형시킨 후, 다시 aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 작용으로 acetate로 변화된 후 krebs cycle을 통하여 지방산과 다른 대사물질로 전환되어 체외로 배설된다.

이와 같이 외부로부터 유입되는 이물질들의 대부분은 대사과정에서 효소의 성질에 따라 기질 특이성과 중복성이 나타나 단일물질에 대한 대사시 작용과

다른 물질이 혼합되어 있을 경우의 작용이 다를 것으로 보인다.

ethanol 대사에 관여하는 알코올 산화계 즉, cytochrome P-450 과 ADH, ALDH 등은 ethanol 뿐만 아니라 여러 가지의 이물질 대사에 있어서 선택성과 중복성을 가지고 있는데 특히, trichloroethylene(TRI) 대사에 있어서 이들 효소는 대사 전반에 걸쳐서 단계적으로 작용하여 TRI를 대사시키는데 결정적인 작용을 한다(Fernandez 등, 1977). TRI는 여러 분야에서 널리 사용되는 중요한 유기용제 중 하나로서 금속표면 세정제, 피혁의 지방제거 및 살충제, 페인트 원료 등에 사용되고 있다(NOISH, 1978).

TRI에 대한 해독(detoxication)대사 연구는 많은 연구자들에 의해서 이루어지고 있는데(Nakajima 등, 1990; Guengerich 등, 1991; 김 등, 1994). TRI 대사를 보면, 먼저 TRI가 기질로 작용하여 이물질 대사 효소인 cytochrome P-450 (Lu와 West, 1980)에 의해서 탄소와 탄소 사이의 이중결합이 분해되어 중간체인 chloral hydrate(CH)로 1차 변형되고(Miller와 Guengerich, 1982), CH는 다시 산화-환원 작용에 있어서 중요한 역할을 하는 탈수소효소(dehydrogenase)들에 의해서 trichloroethanol (TCE-OH)과 trichloroacetic acid(TCA)로 변형되어 체외로 배설된다(Williams, 1959; Daniel, 1963). 이때 TRI 대사의 전반적인 속도조절은 cytochrome P-450에 의해서 CH가 형성되는 단계이며, 간장독성은 반응성이 크고 불안정한 상태인 epoxide에 의해서 유발된다(Allemand 등, 1978).

이와 같이 효소는 작용 및 기질 특이성이 있어 단일물질과 복합물질에 대한 작용에 있어서 차이를 보일 것이 예상되어, 혼합물질에 대한 많은 연구가 수행되고 있다(Nakajima 등, 1988; Okino 등, 1991).

그러므로 본 연구는 산업체 근로자들이 기호음료인 ethanol을 섭취한 후 ethanol이 대사되기 이전

에 직업적으로 유기용제에 다시 폭로될 경우, 폭로되는 유기용제의 대사에 관여하는 효소에 어떠한 영향을 미치는가를 보기 위하여 산업체에서 널리 사용하는 TRI를 선정, 흰쥐를 이용하여 관찰하였다.

## 재료 및 방법

Cytochrome C, NADPH, NADH, sucrose, BSA, pyrazol, acetaldehyde, KCl, sodium hydroxide, ethanol, glycine 등 실험에 관련된 시약은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며, 투여물질인 trichloroethylene은 Aldrich사로부터 구입하였고 그밖의 생화학 시약은 Sigma사와 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다.

실험동물은 국립보건안전연구원으로부터 분양받은 Sprague Dawley(SP-D)계 웅성 흰쥐 6주령( $170 \pm 10$  g)을 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 온도( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ), 습도( $55 \pm 5\%$ ) 및 채광조절(12h light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시킨 후 투여물질을 처리하였다. 실험군은 처리하지 않은 군(untreated)과 ethanol 4g을 투여한 군(E), 150(T1), 300(T2), 600(T3) mg/kg TRI 처리한 3개군, ethanol 4g을 전처리하고 30분 경과 후 150(ET1), 300(ET2), 600(ET3) mg/kg TRI을 처리한 ethanol 전처리군으로 총 8개군으로 분류하였다. TRI는 corn oil에 용해시켜 1일 1회씩 2일간 연속하여 복강주사하였고 ethanol은 구강투여하였으며, 마지막 투여 후 24시간 동안 절식시켜 희생시켰다. 각 실험군은 5마리로 하였다.

### 1. 간 Microsomes 분획의 분리

실험동물을 경부탈골에 의한 방법으로 희생시킨 후 즉시 간을 절제하여 0.9% sodium chloride 용액으로 혈액 및 이물질을 씻어내고, 응고된 혈액 및 지방질

을 제거한 간을 0.25M sucrose 용액으로 균질화한 다음, 차등 원심분리(12,000xg에서 40분, 105,000xg에서 60분)하여 0.15M KCl로 씻어낸 후 침전된 pellet 만을 모아서 0.25M sucrose로 resuspension한 후 (Park과 Kim, 1984) 단백질 정량, cytochrome P-450 monooxygenase 활성도 및 탈수소효소 활성도 등에 사용하였다. 모든 실험과정은 0~4°C에서 수행하였으며 분획된 microsomes은 -70°C에서 보관하였다.

## 2. Cytochrome P-450 Monooxygenase 활성도

간 microsomes 분획의 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법으로 농도를 결정하였으며 P-450과  $b_5$  함량은 Omura와 Sato 방법(1964)과 Werringloer 및 Estabrook(1975)의 방법에 의해서 측정하였다. NADPH P-450 reductase는 Master 등(1967)의 방법에 의해서 측정하였으며, NADH  $b_5$  reductase의 활성도는 Hultquist 방법(1978)에 의해서 수행하였다.

## 3. Alcohol dehydrogenase(ADH) 및 Aldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성도

간 microsomes에 존재하는 ADH의 활성도 측정은 Bonnichsen과 Brink(1955)의 방법으로, ALDH의 활성도는 Tottmar 등(1973)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다.

ADH 활성도 측정은 반응액의 최종 농도 조성(1 ml)을 48 mM glycine sodium hydroxide buffer(pH 9.6), 0.8 mM  $NAD^+$ , 3 mM ethanol과 효소원으로 하였으며, ALDH는 50 mM sodium pyrophosphate buffer(pH 8.5), 1 mM  $NAD^+$ , 2 mM pyrazol, 10 mM acetaldehyde와 효소원으로 하여 반응액의 최종 농도 조성을 1 ml로 하였다. 이들 효소의 활성도 측정은 흡광광도

계를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하고 몰 흡광계수  $6,220 M^{-1}cm^{-1}$  를 이용하여 활성도를 계산하였다.

## 4. 자료분석(자료처리 및 분석)

자료분석을 위해 PC/SAS 프로그램을 사용하여 평균값과 표준오차를 살펴보고 자료의 특성에 따라 각 군별 비교를 위한 t-test, 분산분석(ANOVA)을 실시하였다.

## 연구성적

### 1. 단백질 함량의 변화

TRI 및 ethanol 전처리군에 있어서 microsomal 단백질과 cytochrome P-450,  $b_5$  함량 변화를 본 결과 표 1의 성적을 얻었다.

체내 이물질 흡수시 대사작용과 대사에 관여하는 효소들을 내포하고 있는 microsomal 단백질에 대한 활성도를 측정된 결과, 처리하지 않은 군과 비교 시 TRI 투여군과 ethanol 전처리한 투여군 모두에 있어서 투여 농도에 따른 활성도 변화는 나타나지 않았다( $p>0.05$ ).

체내 흡수된 이물질과 종에 따른 유전적인 형태 및 유전자 발현에 따라 현저한 차이를 보이는 cytochrome P-450의 함량은 처리하지 않은 군의 측정치(1.033 nmol/mg)와 투여군간의 비교시 T 3(0.745 nmol/mg)와 ET3(0.512 nmol/mg) 실험군에서 통계학적인 유의한 감소가 있었고( $p<0.05$ ) 기타의 TRI 단독 처리군 및 ethanol 전처리군에 있어서 통계학적인 차이는 없었다.

간 microsomes에 cytochrome P-450과 함께 존재하며 이물질 및 생체합성물질의 산화-환원 작

용시 전자 공여체로 작용하는 cytochrome b<sub>5</sub>의 함량은 cytochrome P-450과 마찬가지로 처리하지 않은 군(0.316 nmol/mg)과 비교시 T3(0.235 nmol/mg)와 ET2(0.249 nmol/mg), ET3군(0.198 nmol/mg)에서만 통계학적인 차이를 보였고(p<0.05) 나머지 기타의 투여군에서는 통계학적인 유의성이 없었다(p>0.05). 그러나 cytochrome P-450과 b<sub>5</sub>의 함량은 ethanol 단독 처리군(E)을 제외하고 전반적으로 처리하지 않은 군에서의 측정치보다 투여군에 있어서 감소되는 경향을 나타내고 있다.

## 2. NADPH P-450 reductase 및 NADH b<sub>5</sub> reductase 활성도

체내에 있어서 이물질 및 생체 합성물질을 대사시키는 데 중요한 작용을 하는 효소가 mixed function oxidase(MFO)인데, 이때 이들 효소에 전자를 전달해주는 전자-전달계가 NADPH P-450 reductase와 NADH b<sub>5</sub> reductase이다. 그래서 본 실험에서는 TRI 및 ethanol을 전처리하여 이들 물질 대사시 전자-전달계로 작용하는 NADPH P-450 reductase와 NADH b<sub>5</sub> reductase의 활성도를 측정된 결과, 표

Table 1. Effects of trichloroethylene and trichloroethylene with ethanol on the contents of hepatic protein

Substances (mg/kg)	Quantity of Protein		
	Microsomal protein Mean(mg/ml)±SE	Cytochrome P-450 Mean(nmol/mg)±SE	Cytochrome b <sub>5</sub> Mean(nmol/mg)±SE
Untreated	5.87 ± 0.248	1.033 ± 0.1598	0.316 ± 0.0298
T1	5.65 ± 0.238	0.979 ± 0.1129	0.299 ± 0.0293
T2	5.69 ± 0.321	0.849 ± 0.0584	0.269 ± 0.0303
T3	5.92 ± 0.440	0.745 <sup>a</sup> ± 0.0473	0.235 <sup>a</sup> ± 0.0188
E	5.41 ± 0.430	1.087 ± 0.0411	0.303 ± 0.0153
ET1	5.31 ± 0.177	0.914 ± 0.0316	0.276 ± 0.0138
ET2	5.16 ± 0.266	0.885 ± 0.1478	0.249 <sup>a</sup> ± 0.0370
ET3	5.03 ± 0.331	0.512 <sup>a</sup> ± 0.0211	0.198 <sup>a</sup> ± 0.0087

<sup>a</sup>: Significantly different from untreated at  $\alpha=0.05$

Table 2. The effect of chemicals pretreatment on microsomal NADPH C(P-450) reductase and NADH b<sub>5</sub> reductase

Substances (mg/kg)	NADPH C(P-450) Mean±SE	NADH b <sub>5</sub> Mean±SE
Untreated	0.752 ± 0.0430	103.40 ± 7.778
T1	0.717 ± 0.0613	116.34 ± 6.930
T2	0.685 ± 0.0455	139.62 <sup>a</sup> ± 13.528
T3	0.677 ± 0.0482	144.02 <sup>a</sup> ± 7.786
E	0.753 ± 0.0476	144.25 <sup>a</sup> ± 8.218
ET1	0.591 <sup>a</sup> ± 0.0069	119.10 ± 5.147
ET2	0.601 <sup>a</sup> ± 0.0143	156.00 <sup>a</sup> ± 5.286
ET3	0.579 <sup>a</sup> ± 0.0073	151.51 <sup>a</sup> ± 8.543

Unit:  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

<sup>a</sup>: significantly different from untreated at  $\alpha=0.05$

2의 성적을 얻었다.

NADPH P-450 reductase의 활성도는 처리하지 않은 군(0.752  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )과 투여군 간의 비교시 ethanol 4g을 투여한 군(E)을 제외한 투여군 모두에 있어서 처리하지 않은 군보다 감소된 경향을 보이는데, ethanol 전처리군의 ET1(0.591  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), ET2(0.601  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) 및 ET3(0.579  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )군에서 통계학적인 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 flavo protein인 NADH b<sub>5</sub> reductase의 활성도는 처리하지 않은 군(103.40  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )에서보다 투여군에 있어서 증가된 경향을 보였다. T1과 ET1에서는 116.34와 119.10  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 처리하지 않은 군과 비교시 통계학적인 유의성은 없었으나 기타의 투여군인 T2, T3, ET2, ET3군에 있어서는 통계학적으로 유의한 증가가 있었다( $p < 0.05$ ).

또한, ethanol에 의한 전자-전달계의 영향을 보기 위하여 TRI 단독처리군(T1, T2, T3)과 ethanol을 전처리하고 동일한 양의 TRI를 투여한 실험군(ET1, ET2, ET3)간의 비교시 NADPH P-450 reductase 활성도 변화는 TRI 단독 투여군과 ethanol 전처리군간에 통계학적인 차이는 보이지 않았으나( $p > 0.05$ ), TRI 단독 투여군에서보다 ethanol 전처리군에 있어서의 NADPH P-450 reductase의 활성도가 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나 NADH b<sub>5</sub> reductase의 경우는 TRI 단독 투여군과 ethanol 전처리군 모두에 있어서 통계학적인 유의한 차이는 보이지 않았으나( $p > 0.05$ ), ethanol 전처리군에 있어서 NADH b<sub>5</sub> reductase가 증가되는 현상을 나타냈다.

### 3. 간 Microsome ADH와 ALDH 활성도

Phase I components에 의해서 1차 변형된 CH를 TCE-OH와 TCA로 대사시키는데 관여하는 ADH와 ALDH의 활성도를 측정된 결과 표 3의 성

적을 얻었다.

ADH의 활성도는 T2군을 제외한 모든 처리군에 있어서 처리하지 않은 군(0.0140 U/mg)에서보다 통계학적으로 유의한 감소를 보였다( $p < 0.05$ ).

ALDH 활성도는 ADH 활성도와 상반되는 결과로서 처리하지 않은 군(0.0032 U/mg)에서 보다 처리군에 있어서 모두 증가되는 경향을 보였으나 ET2(0.0296 U/mg)군에서만 통계학적인 유의성을 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 TRI 대사에 있어서 ethanol에 의한 영향으로 ADH와 ALDH 활성도가 어떻게 변화되는가를 본 결과, ADH의 활성도는 TRI 단독 투여군(T1, T2, T3)보다 ethanol 전처리군(ET1, ET2, ET3)에 있어서의 활성도가 감소되는 경향을 보이고 있는데, TRI 150mg/kg을 투여한 T1과 ET1을 제외한 T2와 ET2군, T3와 ET3군에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 그러나 ALDH 활성도는 T3와 ET3를 제외한 T1과 ET1, T2와 ET2 실험군간에 있어서 TRI 단독 투여군에서보다 ethanol 전처리군에 있어서 활성도가 증가되는 현상을 나타냈다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

TRI 대사속도를 조절하는 cytochrome P-450은 간장, 폐, 신장, 뇌, 태반 및 피부 등의 세포질 망상조직의 microsome에 cytochrome b<sub>5</sub>와 함께 single polypeptide의 heme 단백질로 존재하는 독특한 단백질로서 이물질뿐만 아니라 생체 내 구성물질을 대사시키는 작용을 한다(Lu와 West, 1980). 이 효소는 여러 가지 동위효소로 구성되어 있으며 각기 다른 아미노산의 결합순서를 가지고 있어(Botelho 등, 1979; Ryan 등, 1980) 기질에 따라 유도되는 동위효소의 유전자 형태도 다양하다(Nebert와 Gonzalez, 1987).

이와 같이 cytochrome P-450은 기질에 대한 작

용 특이성 및 선택성을 가지고 있어 처리물질을 달리한 많은 연구가 수행되고 있다(Patten 등, 1986; Sinclair 등, 1985; Khan 등, 1989; 김 등, 1994).

Johansson 등(1987)에 의하면 acetone, phenobarbital, ethanol 등 유도물질에 따라서 동위효소의 함량이 많은 차이를 보이며, 음식과 더불어 이들 물질 처리시 acetone의 경우 P-450b, e 및 j 형태의 동위효소의 함량이 증가된다고 하였으며, Okino 등(1991)은 TRI 대사에 있어서 ethanol과 phenobarbital이 미치는 영향에 대한 연구 결과, ethanol을 유도물질로 전처리하고 TRI 2000ppm에 폭로된 실험군에서만 cytochrome P-450의 함량이 대조군과 비교시 유의한 증가를 보였으며, cytochrome b<sub>5</sub>의 함량은 500ppm 실험군을 제외하고는 2000, 8000ppm 실험군에서 ethanol 전처리하고 TRI에 폭로시킨 실험군이, TRI에 폭로된 실험군에서보다 감소된 함량치를 보였다.

금번 연구는 이물질 대사에 있어서 폭로 물질간의 상호작용을 보기 위하여 시행되었으며 결과 ethanol을 전처리하고 체중 kg당 TRI 600mg을 투여한 실험군에서 cytochrome P-450과 b<sub>5</sub> 함량이 처리하지 않는 군과 비교시 통계학적으로 유의한 감

소현상을 나타냈다. 이러한 결과를 Okino 등(1991)의 연구결과와 비교시 cytochrome P-450의 함량은 상이한 결과를, cytochrome b<sub>5</sub>의 함량은 비슷한 현상을 보이고 있는데, 투여농도와 시기, 방법 등에 따라서 함량의 차이는 있을 것으로 보이나, 이들 효소가 존재하고 있는 위치와 구조적인 특성, 작용 mechanism, 함량의 양론적인 관계 등을 고려해 볼 때, cytochrome P-450과 b<sub>5</sub>간의 함량이 비례적인 관계를 유지할 것으로 생각되므로, 금번 연구에서 나타난 현상이 일관성이 있는 것으로 보여진다.

체내로 흡수되는 이물질은 흡입경로와 물질의 물리·화학적인 고유의 성질에 따라서 표적기관 및 대사경로가 서로 상이하다. 그러나 이들 이물질의 대사에 있어서 체계적인 대사가 이루어질 때는 대사에 관여하는 전자-전달계의 작용이 수반되어야 하는데, TRI의 대사에 있어서 중추적인 역할을 하는 phase I components인 cytochrome P-450에 전자를 전달하는 전자-전달계가 NADPH P-450 reductase와 NADH b<sub>5</sub> reductase이다(박기현, 1986). 이들 두 전자-전달계는 cytochrome P-450과 b<sub>5</sub>의 함량에 따라 양론적인 차이를 보이는데 (Peterson 등, 1976) 금번 연구 결과를 보면, 두

Table 3. Specific activities for the NAD<sup>+</sup>-dependent ADH and ALDH in microsomes fraction from rats treated with trichloroethylene and mixture ethanol

Substances(mg/kg)	Activity of Liver Enzyme(U/mg of protein)	
	ADH(U/mg)±SE	ALDH(U/mg)±SE
Untreated	0.0140 ± 0.00197	0.0032 ± 0.00014
T1	0.0096 <sup>a</sup> ± 0.00017	0.0040 ± 0.00037
T2	0.0119 ± 0.00109	0.0050 ± 0.00016
T3	0.0109 <sup>a</sup> ± 0.00003	0.0057 ± 0.00053
E	0.0113 <sup>a</sup> ± 0.00020	0.0073 ± 0.00009
ET1	0.0086 <sup>a</sup> ± 0.00094	0.0051 ± 0.00021 *
ET2	0.0089 <sup>a</sup> ± 0.00131 *	0.0296 <sup>a</sup> ± 0.01411 *
ET3	0.0064 <sup>a</sup> ± 0.00046 *	0.0051 ± 0.00054

P<0.05

<sup>a</sup>: Significantly different from untreated at  $\alpha=0.05$ (Duncan)

\*: p<0.05 compared with corresponding trichloroethylene treatment group(t-test)

전자-전달계간의 상이한 차이를 보이고 있다. NADPH P-450 reductase의 경우는 TRI의 농도 증가와 ethanol 전처리에 따라, 그리고 처리하지 않은 군과 비교시 처리군 모두에 있어서 활성도가 감소되는 결과를 보이는데, 이러한 결과는 이미 김 등(1994)에 의해서 보고되었으며, Kawamoto 등(1983)의 연구와 상반되는 결과를 보이고 있다.

일반적으로 ethanol은 유기용제 대사를 억제한다는 보고가 있는데(Liira 등, 1990; Wang과 Nakajima, 1992) 금번 연구에서 TRI의 대사에 있어서 요구되는 전자를 전달하는 전자-전달계에 ethanol이 미치는 영향을 본 결과, 처리하지 않은 군에서보다 ethanol 전처리군에서 NADPH P-450 reductase의 활성도가 감소되었다. 이러한 결과는 Peterson 등(1976)의 연구결과에서 보여주었던 것, cytochrome P-450의 함량 감소에 따른 결과와 ethanol 대사에 있어서 선택적으로 작용하는 효소의 특성에 의한 결과로 생각된다. 또다른 전자-전달계인 NADH b<sub>5</sub> reductase의 활성도를 측정한 결과, NADPH P-450 reductase 측정과 상반되는 결과를 보였다.

이러한 현상은 Kawataki 등(1983)이 보고한 연구에서처럼 재구성체에 있어서 NADPH P-450 reductase의 농도가 낮을 때 NADH b<sub>5</sub> reductase가 더욱 요구된다는 결과와 일치되는 것으로 생각된다. 그러므로 이물질 대사시 요구되는 전자는 기질의 종류와 cytochrome P-450과 b<sub>5</sub>의 함량에 따라 차이를 보이는 것으로 생각된다.

이물질이 체내로 흡입되어 대사되기 위해서는 보다 극성이 큰 물질로 전환되어 특정한 효소들에 의해서 대사변형된 후 phase II components나 scavenger 효소들에 의해서 배설되는데, 이때 극성이 큰 대사변형체를 수산화물로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 효소가 탈수소효소(dehydrogenase)이다.

탈수소효소는 기질에 대한 선택성 및 중복성이 커

서 ethanol(Khanna와 Israel, 1980) 뿐만 아니라 TRI대사에 있어서 활성화된 epoxide인 CH를 TCE-OH와 TCA로 변환시키는 역할을 한다(Daniel, 1963; Byngton과 Leibman, 1965). Kawamoto 등(1987)에 의하면 낮은 농도(0.25 mM 이하)에서는 TCE-OH보다 TCA의 배설이 증가되고, 높은 농도(0.5 mM 이상)에서는 많은 양의 TCE-OH가 생성된다고 하였다. 또한 Nakanishi 등(1978)에 의하면 TRI를 폭로시킨 후 간에 있어서 ALDH 활성도와 혈중 acetaldehyde 농도를 측정한 결과, TRI 대사시 혈중의 acetaldehyde 농도가 증가했다고 하였으며, ADH 활성도는 세포질내에 분포하는 기관에 따라서 활성도의 차이를 보인다는 등 연구자간에 이견이 많다(Lumeng 등, 1979; Teitz, 1964; Marjanen, 1972; Tottmar 등, 1973).

Ethanol과 TRI에 선택적인 작용을 하는 ADH와 ALDH에 대한 금번 연구결과, ADH와 ALDH는 서로 상반되는 결과를 나타냈다. ADH 활성도는 TRI 단독 처리군이 처리하지 않은 군보다 감소되는 결과를 보였으며 ethanol 전처리한 실험군에서도 처리하지 않은 군보다 감소하는 현상을 보였다. ALDH 활성도는 투여군 모두에 있어서 처리하지 않은 군보다 증가된 수준을 보였다. 이러한 현상은 방사성으로 표지된 ethanol을 경구투여하고 간의 subcellular fraction에서 ethanol 및 acetaldehyde를 측정한 결과 시토졸의 ADH에 의해서 형성된 aldehyde가, 미크로솜 ALDH에 의해서 산화되는지 혹은 mitochondria의 ALDH에 의해서 산화되는지 불분명하다고 주(1992)가 보고하였듯이 정확히 단정하기는 어려우나 Tottmar 등(1973)의 연구결과와 관련하여 생각해 보면 ALDH가 microsomes에서 존재하는 양이 많은 것으로 보아 microsomes에 있어서 ALDH의 활성도 증가가 나타난 것으로 생각된다. 또한 microsomes에 있어서 ADH 감소는 ADH가 주로 분포하고 있는 기관이 시토졸로서



microsomes에 있어서의 활성도 감소를 보인 결과 기인된 현상으로 보인다.

ethanol이 TRI대사에 미치는 영향을 효소 활성도와 연관하여 본 결과, NADPH P-450 reductase와 ADH 활성도는 ethanol 전처리군이 TRI 단독 처리군보다 감소된 측정치를 보였으며 NADH b<sub>5</sub> reductase와 ALDH 활성도는 증가된 수준을 보였다.

Nakajima 등(1988)에 의하면 저농도의 TRI 폭로시 ethanol이 TRI 대사를 촉진시킨다는 보고가 있었으며, Sato 등(1991)은 사람에게 있어서 ethanol이 혈중 TRI를 증가시키고 요중 TCE-OH의 배설량을 감소시킨다고 보고하였으며, TRI의 대사산물인 TCE-OH와 TCA에 있어서 TCE-OH가 TCA로 변환되는 것을 ethanol이 억제시킨다는 보고도 있다(Muller 등, 1975). 금번 연구에 있어서 TRI의 대사산물인 TCE-OH와 TCA의 배설량을 측정할 결과(시험과정에 있어서 몇 개의 시료를 손실하여 실험결과를 나타내지 않았음), ethanol을 전처리한 실험군에 있어서 TCA의 배설량이 감소되는 경향을 보여 Muller 등(1975)의 연구결과와 일치하는 것을 관찰하였다.

이러한 결과를 효소 활성도와 연관하여 보면, CH양을 측정하지 않아 단정하기는 어려우나 TRI의 대사속도를 조절하는 cytochrome P-450에 전자를 전달하는 NADPH P-450 reductase의 활성도가 ethanol 전처리한 군에서 감소되는 것을 보아 ethanol이 TRI의 대사 중간체인 CH의 형성을 다소 억제시키는 것으로 생각된다. 또한 대사산물이 배설되는 경향(실험결과를 나타내지 않았음)과 탈수소효소인 ADH 및 ALDH의 활성도를 보면, ADH의 경우 TRI와 ethanol 전처리군 모두에 있어서 활성도의 감소를 보이는데 이는 microsomes에서 보다 cytosol에 있어서의 양론적인 분포가 커서(Lumeng 등, 1979) 감소된 결과로 보이며, ALDH는 TRI의 투여농도에 따른 활성도의 증가를 보여 Nakanishi 등(1978)의 연구결과와 일치하는

것으로 보인다. 그러나 ALDH의 활성도는 증가되고 TRI의 요중 대사산물인 TCA는 감소하는 상반된 현상을 보이는데, 이러한 결과는 ethanol이 TRI의 대사 중간체인 CH를 TCA로 대사변형시키는 과정에 있어서의 영향을 미치기보다는 CH의 형성과정과 TCE-OH가 TCA로 변하는 과정에 영향을 미쳐서 나타난 결과라고 생각된다.

## 결 론

본 연구는 Trichloroethylene 대사에 ethanol이 미치는 영향을 보기 위하여 시도하였다.

Trichloroethylene(TRI)는 corn oil에 용해시켜서 150, 300, 600mg/kg TRI로 1일 1회씩 2일 동안 주사하였으며, ethanol 전처리군은 ethanol을 구강투여하고 30분 경과 후 TRI를 복강주사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Cytochrome P-450과 b<sub>5</sub>의 함량은 TRI 단독투여군과 ethanol 전처리군에 있어서 TRI 증가에 따라 역상관관계를 보였다.
2. NADPH P-450 reductase 활성도는 TRI 투여량 증가에 따라 감소되었으나 처리하지 않은 군보다 ethanol 전처리군에서 현저한 감소를 보였다.
3. NADH b<sub>5</sub> reductase의 활성도는 TRI 투여군에서 양적인 상관성을 보였으나 300(T2), 600(T3)mg/kg TRI를 단독 처리한 군과 ethanol 전처리군인 ET2, ET3에서 처리하지 않은 군과 비교시 통계학적으로 유의한 증가를 보였다(P<0.05).
4. 처리하지 않은 군과 TRI 단독처리군, ethanol 전처리군을 비교시 ADH 활성도는 감소, ALDH 활성도는 증가를 보였다(P<0.05).

이상의 결과를 보면 ethanol이 TRI 대사의 첫단

계인 epoxide 형성과 TCE-OH에서 TCA로의 변화를 억제시키는 것으로 보인다.

### 참고문헌

- 김기웅, 송용범, 장성근. 급성 납중독된 흰쥐의 이 물질 대사효소의 활성도에 관한 연구. 한국생화학회지 1994;27(2):87-93
- 김기웅, 강성규, 양정선, 박인정, 문영한. Trichloroethylene 처리한 흰쥐의 간 마이크로솜 Alcohol dehydrogenase와 Aldehyde dehydrogenase 활성도에 관한 연구. 한국산업위생학회지 1994;4(2):148-156
- 박기현. 생화학총설집, 서울, 한국생화학회, 1986, 309-334
- 주충노. 생명과학심포지움, 한국인삼연초연구소, 1992, 131-169
- Allemand h, Pessayre D, DescatoireV, Degott C, Fildmann G, and Benhamou JP. *Metabolic activation of trichloroethylene into a chemically reactive metabolite toxic to the liver. J Pharmacology Ther* 1987;204:714-723
- Bonnichen RK and Brink NG. *Liver alcohol dehydrogenase. Methods in Enzymology* 1955;78:495-500
- Botelho LH, Ryan DE, and Levin W. *Amino acid compositions and partial amino acid sequences of three highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, or 3-methylcholanthrene. J Biol Chem* 1979;264:5635-5640
- Byngton KH, Leibman KC. *Metabolism of trichloroethylene in liver microsome II. Identification of the reaction products as chloral hydrate. Molecular Pharmacology* 1965;1:247-254
- Daniel JW. *The metabolism Cl-labelled trichloroethylene and tetrachloroethylene in the rat. Biochem pharmacol* 1963;12:795-802
- Daniel JW. *The metabolism of Cl-labelled trichloroethylene in the rat. Biochem Pharmacol* 1963;12:795-802
- Elleborn MJ, Barceloux DG. *Medical toxicology diagnosis and treatment of human poisoning. New York, Elsevier Science Publishing Co, 1988, 782*
- Fernandez JG, Droz PO, Humbert BE, and Caperos JR. *Trichloroethylene exposure simulation of uptake, excretion, and metabolism using a mathematical model. Br J Ind Med* 1977;34:43-55
- Goodman LS, Gilman A. *The pharmacological basis of therapeutic. 5th edition. New York, Macmillan Publishing Co, 1975, 137*
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. *Role of human cytochrome p-460IIIe1 in the oxidation of many low molecular weigh cancer suspects. Chem Res Toxicol* 1991;4:168-179
- Hultquist DE. *Methemoglobin Reduction System of Erythrocytes. Methods in Enzymeol* 1978;52:463-473
- Johansson I, Ekstrom G, Scholte B, Puzycki D, Jornvall H, and Ingelman-Sundberg M. *Ethanol-, Fasting-, and Acetone-Inducible Cytochrome P-450 in Rat Liver: Regulation and Characteristics of Enzymes Belonging to the IIB and IIE Gene Subfamilies. Biochemistry* 1988;27:1925-1934
- Kawamoto T, Hobara T, Nakamura K, Imamura A, Ogino K, Kobayashi H, Iwamoto S, and Kawataki T, Maeda K,

- Ishii K, Yamazoe, Kato R. *A high spin form of cytochrome P-448 highly purified from PCB-treated rats II: Characteristic requirement of cytochrome b<sub>5</sub> for maximum activity.* *Biochem Pharmacol* 1983;32:2479–2483
- Khanna JM, Israel Y. *Ethanol metabolism.* *Int Rev Physiol* 1980;21:275
- Khan WA, Kuha C, Merk HF, Park SS, Gelboin HV, Bickers DR, and Mukhtar H. *Isozyme-specific monoclonal antibody-directed assesment of induction of hepatic cytochrome P-450 by clotrimazole.* *Drug Metab Disp* 1989;17(4):360–364
- Lieber CS. *Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury.* *Acta Med Scand* 1985;(suppl):11
- Lieber CS, Decarli LM. *Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding.* *Science* 1968;162:917
- Liira J, Riihimaki V, Engstrom K. *Effects of ethanol on the kinetics of methylethyl ketone in man.* *Br J Ind Med* 1990;47:325
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. *Protein measurement with folin phenol reagent.* *J Biol Chem* 1951;193:401–401
- Lu AYH and West SB. *Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450.* *Pharmacol Rew* 1980;31:277
- Lumeng L, Bosron WF, Li T-K. *Quantitative correlation of ethanol elimination rats in vivo with liver alcohol dehydrogenase activity in fad fasted and food restricted rats.* *Biochem Pharmacol* 1979;28:1547–1551
- Marjanen L. *Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver.* *Biochem J* 1972;127:633–639
- Master BSS, Williams CHJr, Kamin H. *The preparation and properties of Microsomal TPNH-Cytochrome C Reductase from Pig Liver.* *Methods in Enzymol* 1967;10:565–580
- Miller RE and Guengerich FP. *Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P-450:Evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide.* *Biochemistry* 1982;21:1090–1097
- Muller G, Spassovski M, Henschler D. *Metabolism of trichloroethylene in man: Interaction of trichloroethylene and ethanol.* *Arch Toxicol* 1975;33:173
- Nakajima T, Okino T, Okuyama S, Kaneko T, Yonekura I, and Sato A. *Ethanol-induced Enhancement of Trichloroethylene Metabolism and Hepatotoxicity: Difference from the Effect of Phenobarbital.* *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;94:227–237
- Nakajima T, Wang RS, Murayama N, Sato A. *Three forms of trichloroethylene metabolizing enzymes in rat liver induced by ethanol, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene.* *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;102:546–552
- Nakanishi S, Shiohara E, Tsukada M, Yamazaki H, Okumura K. *Acetaldehyde level in blood and liver aldehyde dehydrogenase activities in trichloroethylene treated rats.* *Arch Toxicol* 1978;41:207–214
- Nebert DW, Gonzalez FJ. *P450 Gene: Structure, Evolution and Regulation.* *Ann Rev Biochem* 1987;56:945–993
- NIOSH. *Special Occupational hazard Review with Control Recommendation trichloroethylene, US. Dept. of Health Education and Welfare Public Health Service, 1978,1–59*

- Okino T, Nakajima T, and Nakano M. *Morphological and biochemical analysis of trichloroethylene hepatotoxicity: Differences in ethanol- and phenobarbital- pretreated rats. Toxicol Appl Pharmacol* 1991;108:379–389
- Olsen H, Osterud B. *Effects of ethanol on human blood fibrinolysis and coagulation. Alcohol-Alcohol* 1987;1:591
- Omura T, Sato R. *Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem* 1964;239:2370–2378
- Orme-Johnson WA, and Ziegler DM. *Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes. Biochem Biophys Res Comm* 1965;21:78
- Park KH and Kim CR. *Induction of the different forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. Korean Biochem J* 1984;17(1):10–19
- Patten CJ, Ning SM, Lu AYH, and Yang CS. *Acetone-Inducible Cytochrome P-450: Purification, Catalytic Activity, and Interaction with Cytochrome b<sub>5</sub>. Arch Biochem Biophys* 1986; 251(2):629–638
- Peterson JA, Ebel RE, O’Keeffe DH, Matsubara T and Estabrook RW. *Temperature dependence of cytochrome P-450 reduction. J Biol Chem* 1976;251:4010–4016
- Ritchie JM. *The pharmacological basis of therapeutic. 7th edition. New York, Macmillan Publishing Co, 1980, 376–388*
- Ryan DE, Thomas PE and Levin W. *Hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with isosafrol. J Biol Chem* 1980;255:7941–7955
- Sakai T. *Induction of cytochrome P-450, cytochrome b<sub>5</sub>, NADPH-cytochrome C reductase and change of cytochrome P-450 isozymes with long-term trichloroethylene treatment. Toxicology* 1988;53:239–249
- Sato A, Endoh K, Kaneko T, Johanson G. *Effects of consumption of ethanol on the biological monitoring of exposed to organic solvent vapour: A simulation study with trichloroethylene. Br J Ind Med* 1991;48:548–556
- Shugalei IuS, DEgtiar VV, Butvin IN, Grivenko GP. *Effects of alcohol intoxication on ascorbic and dehydro-ascorbic acid levels in rat tissue and human blood. Ukr-Biokhim-Zh* 1986;58:81
- Sinclair J, Cornell NW, Zaitlin L, and Hansch C. *Induction of cytochrome P-450 by alcohols and 4-substituted pyrazoles. Bioch Pharm* 1986;35(4):707–710
- Teitz A, Lindberg M, and Kennedy EP. *J Biol Chem* 1964;239:4081–4090
- Tottmar SOC, Pettersson H and Kiessling K-H. *The Subcellular Distribution and Properties of Aldehyde Dehydrogenases in Rat Liver. Biochem J* 1973;135:577–586
- Wang RS, Nakajima T. *Effects of ethanol and phenobarbital treatments on the pharmacokinetics of toluene in rats. Br J Ind Med* 1992;49(2):104–112
- Werringloar J and Estabrook NR. *Heterogeneity of liver microsomal cytochrome P-450: The spectral characterization of reactants with reduced cytochrome P-450. Arch Biochem Biophys* 1975;167:270–286
- Williams RT. *In detoxification mechanisms. John Wiley & Sons, New York 1959, 29–30*