

# 에탄올 장기 투여에 의한 쥐 심근조직의 산화적 스트레스와 생체내 항산화 효소활성의 변화

오세인 · 박정수 · 박영철 · 김초일\* · 박상철

서울대학교 의과대학 생화학교실, 한국식품위생연구원 영양연구부\*

## Effect of Chronic Ethanol Administration on Oxidative Stress and Cellular Defence System in Rat Myocardium

Oh, Se In · Park, Jung Soo · Park, Young Chul  
Kim, Cho-II\* · Park, Sang Chul

Department of Biochemistry, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

\*Nutrition Research Department, Korea Institute of Food Hygiene, Seoul, Korea

### ABSTRACT

The level of oxidative tissue damage caused by free radicals generated from ethanol oxidation was determined in the myocardium of chronic ethanol fed-rats and the protective action of various radical scavenging enzymes was monitored, also. Adult male Sprague-Dawley rats were given ethanol in an amount of 36% of total calories *via* Lieber-DeCarli liquid diet for 6 weeks. Control group was pair-fed with the diet containing isocaloric amount of dextrin-maltose instead of ethanol. Chronic ethanol administration resulted in the increased amount of myocardial thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the parameter of lipid peroxidation, under our experimental condition. Chronic ethanol ingestion did not cause any change in activities of either glutathione peroxidase or glutathione reductase while it increased that of catalase. On the other hand, the activities of glutathione transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase were decreased after ethanol treatment. Therefore, chronic ethanol administration seemed to cause considerable changes in cellular defense function against oxidative tissue damage in rat myocardium through glutathione utilizing system and radical generation system. However the ultimate net result of chronic ethanol ingestion on the myocardium of rat was the oxidative tissue damage revealed by increased TBARS content. (*Korean J Nutrition* 29(7) : 721~728, 1996)

**KEY WORDS** : thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) · catalase, Glutathione peroxidase · glutathione reductase · glutathione transferase · glucose-6-phosphate dehydrogenase.

### 서 론

심근 세포의 손상은 여러인자들의 복합적인 작용에 의해 일어나며 그 중 산화적 스트레스(oxidative stress)

채택일 : 1996년 7월 16일

는 심근 세포 손상을 일으키는 주된 인자가 될 수 있다고 보고되었고, 또한 만성 에탄올 섭취에 따른 심근 세포 손상은 잘 알려져 있다<sup>1)2)</sup>. 에탄올에 의해 심근의 대사, 수축기능과 미세구조가 손상되며, 특히 좌심실의 수축성이 유의하게 감소된다. 이런 손상의 병인에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았으나, 만성적으로 에탄올을 섭취한

쥐의 심근에서 지질과산화정도가 증가하였으며<sup>3,5)</sup>, 이것이 에탄올 유래 심근조직손상에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다<sup>6,7)</sup>.

장기간 에탄올을 섭취시킨 후 spin-trapping agent ( $\alpha$ -phenyl-*N*-*t*-butylnitron)를 포함하고 있는 에탄올을 부차적으로 투여하였을 때 쥐의 심장에서 지질라디칼인 탄소 중심 프리라디칼(carbon-centered free radical)이 검출되었으며<sup>8)</sup>, 또한 이와같은 프리라디칼은 에탄올이나 아세트알데히드를 급성투여한 쥐의 심장 추출물에서도 높은 농도로 검출되었다<sup>9)</sup>. 즉 이는 에탄올 섭취가 심근조직에서의 산소라디칼의 다량생성과 관계됨을 보여주는 것이다.

생체는 산소라디칼 유래 조직손상에 대한 세포내 방어 기전으로서 여러가지 항산화제와 산소라디칼 제거 체계를 포함하고 있다. 이와 관련해 Oei 등<sup>10,11)</sup>은 장기에탄올 투여후 심장근육에서도 간에서와 유사한 항산화효소의 변화를 보고하였으며, reactive oxygen species (ROS)가 에탄올에 의한 심장의 기능저하에 관여한다고 제시하였다. Antonenkov와 Panchenko<sup>12)</sup>는 장기에탄올 섭취에 의해서 심근의 catalase 활성은 증가하나 과산화물 대사와 관련된 다른 효소의 활성에는 유의한 변화가 없었다고 보고하였다. 즉 catalase는 산소라디칼에 의한 조직손상을 방어하는데 관여하므로, 이러한 효소활성의 증가에도 불구하고 산화성 조직 손상이 심근조직에서 높게 나타난다는 보고<sup>3,4)</sup>는 에탄올 유래 조직손상기전에 대한 보다 집중적인 연구가 필요함을 시사한다.

따라서 본 연구에서는 에탄올을 장기 섭취한 쥐심장의 산화적 변화와 이러한 산소라디칼성 세포 손상에 대한 조직의 보호능의 변화를 알아보고자 하여 Lieber-DeCarli 표준에탄올 액체 식이를 이용하여 흰쥐에게 에탄올을 장기 투여한 후, 심근조직의 산소라디칼 유래 조직손상정도를 비교분석하였고 지질 과산화정도의 척도로써 thiobarbituric acid reactive substances(TBA-RS)를, 그리고 단백질 과산화정도의 척도로써 단백질 카르보닐기 함량을 측정하였다. 그리고 산소라디칼성 손상으로부터 생체를 보호하는 항산화 효소계의 척도로써 catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase와 glutathione transferase의 활성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

이유된 Sprague-Dawley종 흰쥐 숫컷을 서울대 의과대학 동물실에서 공급받아 체중이 120~180g이 될 때까지

일반 고형 사료(삼양)로 일정 기간 사육하여 실험에 사용하였다. 사육 환경은 기온 22°C, 습도 50%, 12 hr dark/light cycle을 유지하였다.

### 2. 에탄올 투여

쥐들은 한 마리씩 stainless steel wire-bottomed cage 에서 사육하였고 각 군은 weight-matched pairs로 군 당 6마리로 나누었다. 에탄올 식이에는 에탄올을 5%(w/v) 수준으로 첨가하였으며 에탄올로 부터 공급되는 열량은 총 열량의 36%에 해당하였다. 본 실험에서는 Lieber-DeCarli 액체 식이<sup>13)</sup>를 사용하였고 이 실험 식이의 조성은 Table 1과 같다. 식이 조제는 Dyets 사(Bethlehem, Pennsylvania)로 부터 분말식이를 구입하여 Lieber와 DeCarli<sup>13)</sup>의 방법에 따라 매일 식이 공급직전에 조제하였다. 이 액체 식이는 에탄올 자체의 독성 효과를 영양 불량에 의한 영향과 분리하여 평가할 수 있도록 충분한 영양 공급을 할 뿐만 아니라 에탄올을 충분한 양 투여할 수 있는 에탄올 표준 식이이다.

Lieber-DeCarli 액체 식이를 에탄올군에게는 *ad libitum*으로 주고 매일 같은 시각에 전날의 식이 섭취량을 조사하여 에탄올 대신 같은 열량의 dextrin-maltose를 포함한 대조군 식이를 대조군에게 pair-feeding하였다. 5% 에탄올 식이를 시작하기 전에, 실험 식이와 dex-

**Table 1.** Composition of liquid diet for rat

Component	Concentration g/liter(1000 kcal liquid diet)
Casein	41.4
L-Cystine	0.5
DL-Methionine	0.3
Corn oil	8.5
Olive oil	28.4
Safflower oil	2.7
Dextrin maltose	115.2 <sup>1)</sup>
Choline bitartrate	0.53
Fiber	10.0
Xanthan gum Vitamins and minerals <sup>2)</sup>	3.0

1) In the ethanol formula, replaced by 25.6g of dextrin maltose and 50g of ethanol.

2) Vitamins(1000 kcal) : thiamin hydrochloride, 1.5 mg ; riboflavin, 1.5mg ; pyridoxine hydrochloride, 1.75 mg ; nicotinic acid, 7.5mg ; calcium pantothenate, 4.0mg ; folic acid, 0.5mg ; biotin, 50 $\mu$ g ; vitamin B<sub>12</sub>, 25 $\mu$ g ; p-aminobenzoic acid, 12.5mg ; inositol, 25mg ; vitamin A, 6000IU ; vitamin D, 400IU ; vitamin E, 30IU ; and vitamin K, 125 $\mu$ g. Minerals(mg/1000 kcal) : calcium, 1300 ; phosphorus, 1000 ; sodium, 255 ; potassium, 900 ; magnesium, 125 ; manganese, 13.5 ; iron, 8.8 ; copper, 1.5 ; zinc, 7.5 ; iodine, 0.05 ; selenium, 0.025 ; chromium, 0.5 ; chloride, 390 ; sulfate, 250 ; and fluoride, 0.25.

trin-maltose 외의 조성은 같으나 에탄올 농도를 1%, 3%로 하는 적응 식이를 각각 2일씩 준 후 5% 에탄올 식이를 42일(6주)동안 공급하였다. 42일째 되는 날에는 식이분량을 둘로 나누어 ½은 아침에 그리고 나머지 ½은 저녁에 주고 그 다음날 오전에 쥐들을 단두하여 희생하였다. 체중은 일주일에 한번씩 식이를 공급하기 전에 측정하였다.

### 3. 시료의 수집 및 분획

희생된 쥐를 개복하여 심장을 적출한 후 차가운 식염수로 세척하여 혈액을 제거하고 여과지로 blot-drying 하여 무게를 측정하고 분획시까지 -70℃에 보관하였다. 시료 분획을 위해 -70℃에 보관한 심장을 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 1mM dithiothreitol(DTT)을 함유하고 있는 차가운 1.15% KCl 용액내에서 가위로 세절하고 조직분쇄기(Teflon pestle; S63C, Tri-R Instruments, USA)로 4℃에서 균질하게 마쇄하여 10% 균질액을 얻었다. 결체조직, 세포조직과 편, 핵을 제거하기 위하여 이 균질액을 4℃에서 10분간 800g로 원심분리(H50E-TR, Hanil Centrifuge Co., Korea) 하여 상층액을 취했다. 이것을 다시 4℃에서 10분간 13,200g로 원심분리(VS-15000CF, Vision Scientific Co., Korea)하여 그 상층액을 취하고 다시 4℃에서 1시간 동안 105,000g로 초고속 원심분리(TL-100, Beckman, USA)하여 세포질(상층액)을 취해 -70℃에 여러 aliquots으로 나누어 보관하면서 분석에 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0~4℃에서 실시하였다.

### 4. 심근조직의 산화성 손상 정도의 측정

심근의 thiobarbituric acid reactive substances 함량은 Uchiyama와 Mihara의 방법<sup>14)</sup>에 따라 지질과산화 정도의 지표로써 측정하였다. 즉, 10%(w/v) 심장균질액은 800g에서 10분간 원심분리해 침전물을 제거한 상층액만 사용하였다. 이 균질액 0.5ml에 1% phosphoric acid 3ml을 첨가하고 0.6% thiobarbituric acid (TBA) 용액 1ml을 첨가한 후 30초간 vortex mixer로 잘 혼합했다. 유리 구슬로 마개를 하여 100℃에서 45분간 증탕한 후 반응 시험관을 찬물에 빨리 식혔다. TBA-RS를 추출하기 위하여 4ml의 *n*-butanol을 첨가하여 강하게 혼합한 후 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 butanol 층을 분리하였다. *n*-Butanol을 reference로 하여 535nm와 520nm에서 시료에서 분리된 butanol 층의 흡광도를 측정(Uvikon930, Kontron Instruments, Switzerland)하여 그 차를 구했다. 표준 용액으로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane(TEP)을 사용하였고 심근조직의 과산화물의 양은 mg protein당 th-

iobarbituric acid reactive substances의 nmoles로 표시하였다.

단백질 카르보닐기의 함량은 Levine 등의 방법<sup>15)</sup>을 변형하여 측정하였는데 2.0mg의 단백질을 포함하는 세포질 두 aliquots을 각각 원추형 원심관에 넣고 동일 용량의 10% trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 단백질을 침전시켰다. 한 원심관의 단백질에는 2 N HCl을 1ml 가하였고 다른 한쪽에는 2 N HCl을 포함하고 있는 10mM 2, 4-dinitrophenyl hydrazine(DNPH)을 동량 가한 다음 25℃에서 1시간 방치하면서 10분마다 vortex mixer로 잘 섞어주었다. 다시 10% TCA 1ml씩을 가해 침전시키고 ethanol : ethyl acetate(1 : 1, v/v) 용액 2ml로 세번 세척한 후 침전물을 6M guanidine HCl로 용해시켰다. 이들의 흡광도를 370nm에서 6M guanidine HCl을 reference로 사용해 측정하여 이로부터 지방족 hydrazone 화합물의 370nm에서의 분자 흡광 계수(22.0mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)를 이용하여 카르보닐기의 nmole 수를 산출하였고 mg protein당 카르보닐기의 nmoles로 표시하였다.

### 4. 심근조직의 항산화 효소계의 측정

Catalase 활성도는 Aebi의 방법<sup>16)</sup>에 따라 240nm에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 흡광도가 감소하는 것으로 심근조직의 균질액에서 측정하였으며 활성단위는 Aebi가 추천한 대로 속도상수를 이용해서 표시하였다. 세포질 분획의 glutathione peroxidase 활성도는 Tappel의 방법<sup>17)</sup>을 이용하여 측정하였고 기질로는 cumene hydroperoxide (cumene-OOH)를 사용하였으며 340nm에서의 분자 흡광계수 6.22mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>를 이용하여 mg protein당 1분 동안 산화되는 NADPH의 nmoles로 표시하였다. Glutathione reductase 활성도는 Carberg와 Mannervick의 방법<sup>18)</sup>을 사용하여 세포질에서 측정하였으며 glucose 6-phosphate dehydrogenase 활성도는 균질액에서 Löhr와 Waller의 방법<sup>19)</sup>에 의해 측정하였다. Glutathione transferase의 활성도는 세포질에서 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(CDNB)과 glutathione을 기질로 사용하는 Habig 등의 방법<sup>20)</sup>을 사용하여 측정하였으며 CDNB의 340nm에서의 molar extinction coefficient 9.6mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>를 사용해 계산하여 mg protein당 1분 동안 포함되는 CDNB의 nmoles로 표시했다.

### 5. 단백질 함량측정

원심분리하여 결체조직을 제거한 심장균질액 및 세포질의 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 물질로 사용하여 Bradford 방법<sup>21)</sup>으로 측정하였다.

6. 실험 data의 통계처리

실험의 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 통계처리하였다. 실험군별로 데이터의 평균과 표준 오차를 산출하였고, 실험군의 평균치간의 차이의 유의성은 Student's *t*-test로 검정하였다.

결 과

1. 심장의 무게비

에탄올군의 체중 100g에 대한 심장 무게는  $0.29 \pm 0.01$ g이었으며 pair-fed 대조군에서는  $0.30 \pm 0.01$ g로 군간에 유의적인 차이는 없었다.

2. 심근조직의 산화성 손상 정도

심근조직의 thiobarbituric acid reactive substances 함량은 Fig. 1에서 보듯이 Lieber-DeCarli 액체 식이를 사용하여 총 열량의 36%를 에탄올로 장기간 섭취시킨 에탄올군에서는  $0.583 \pm 0.003$ nmol/mg protein으로, pair-fed 대조군의  $0.332 \pm 0.036$ nmol/mg protein에 비해 76% 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그러나 심근조직의 단백질 카르보닐기 함량은 에탄올군에서  $2.276 \pm 0.145$ nmol/mg protein이고 pair-fed 대조군에서는  $2.120 \pm 0.112$ nmol/mg protein이었다. 따라서 만성 에탄올 투여에 의해 심근조직의 지질과산화 정도는 유의적으로 증가하였으나 단백질 과산화 정도의 변화는

유의하지 않았다.

3. 심근조직의 항산화 효소계의 측정

Fig. 2에서 보듯이 심장근질액의 catalase 활성은 그 속도상수가 pair-fed 대조군에서  $0.130 \pm 0.014$ /sec/mg protein였고 장기 에탄올 투여군에서는  $0.225 \pm 0.019$ /sec/mg protein로서 만성에탄올 투여에 의해 72% 정도의 유의한 증가가 있었다( $p < 0.05$ ). 에탄올 투여가 초래하는 산소라디칼 유래 조직 손상에 대한 세포의 보호 장치로서 glutathione 이용효소계의 변화(Table 2)를 알아보았을 때 cumene hydroperoxide를 기질로 하여 측정된 심장세포질의 glutathione peroxidase 활성은 Lieber-DeCarli 액체 식이를 사용한 pair-fed 대조군에서는  $197.7 \pm 10.7$ mU/mg protein이고 에탄올로 총열량의 36%를 섭취한 에탄올군에서는  $191.9 \pm 13.7$ mU/mg protein으로 그 차이가 유의적이지 않았다. 심장세포질의 glutathione reductase 활성 또한 pair-fed 대조군에서는  $23.0 \pm 1.5$ mU/mg protein이고 에탄올군에서는  $22.7 \pm 0.8$ mU/mg protein으로 에탄올 장기 섭취에 의해 유의하게 변화하지 않았다. 반면, glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성은 대조군에서는  $6.61 \pm 0.51$ mU/mg protein인데 비해 에탄올군에서는  $5.00 \pm 0.33$ mU/mg protein으로 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ).

또한, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)을 기질로 하여 측정된 심장세포질의 glutathione transferase 활성도 pair-fed 대조군에서는  $42.0 \pm 2.3$ mU/mg protein이고 에탄올군에서는  $34.1 \pm 1.8$ mU/mg protein으로 장기간 에탄올 섭취에 의하여 유의하게 감소하였다

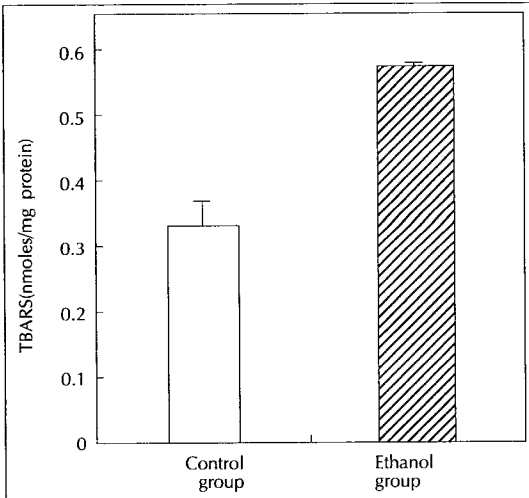


Fig. 1. Effect of chronic ethanol administration on ethanol-induced lipid peroxidation. Values are expressed as mean ± SEM of 4 rats and significantly different at  $p < 0.01$  by Student's *t*-test. Samples were 10% heart homogenate spun at 800g for 10min to remove connective tissue. Thiobarbituric acid reactive substances content in the heart was measured as a marker of lipid peroxidation.

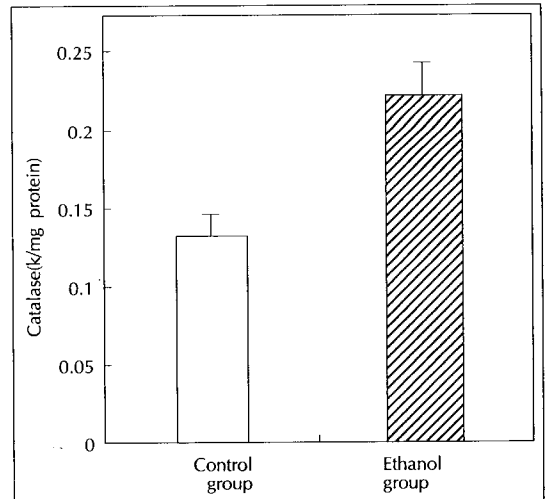


Fig. 2. Effect of chronic ethanol administration on myocardial catalase activities. Values are expressed as mean ± SEM of 4 rats and significantly different at  $p < 0.05$  by Student's *t*-test.

**Table 2.** Effect of chronic ethanol administration on enzyme activities in glutathione utilization system

Enzyme	Group		p <sup>1)</sup>
	Pair-fed control	Chronic ethanol	
GPx <sup>2)</sup> (mU <sup>3)</sup> /mg protein)	197.6±10.7 <sup>4)</sup>	191.8±13.7	NS <sup>5)</sup>
GR(mU/mg protein)	23.1±1.5	22.7± 0.8	NS
G-6-PDH (mU/mg protein)	6.6±0.5	5.0± 0.3	< 0.05
GST(mU/mg protein)	42.0±2.3	34.1± 1.7	< 0.05

1) Statistical significance was determined by Student's t-test. 2) Abbreviations : GPx, glutathione peroxidase ; GR, glutathione reductase ; G-6-PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase ; GST, glutathione transferase. 3) Milliunit 4) Each value represents the mean±SEM of 4 rats. 5) NS, not significant

(p < 0.05).

## 고 찰

장기적으로 에탄올을 섭취한 쥐의 심장근질액에서 지질 과산화 정도를 알아보기 위하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량을 측정하였을 때 유의하게 증가하였다(p < 0.01, Fig. 1). 이는 장기적으로 에탄올을 섭취시키면 쥐의 심장근육에서 지질과산화정도가 증가한다는 보고<sup>34)</sup>와 일치하며 2주간 에탄올을 포함한 식이를 섭취시켰던 쥐에게 spin-trapping agent( $\alpha$ -phenyl-N-t-butyl nitron)를 부차적으로 투여하여 측정하였을 때 심장에서 자유라디칼이 생성되었다는 보고<sup>8)</sup>와도 부합되는 결과이다.

에탄올 섭취가 산소라디칼 생성과 관련되는 기전으로는, 과량의 에탄올이 산화되는 과정에서 미크로솜 분획의 cytochrome P-450 mixed function oxidase(MFO) 체계 특히, cytochrome P450 II E1이 가동되는 과정<sup>22)23)</sup>과, 세포질에서는 molybdo-flavoenzyme인 xanthine oxidase(XO)나 aldehyde oxidase에 의해서, 그리고 미토콘드리아 호흡사슬의 이용등이 있다. 그러나 심근조직에서는 cytochrome P450의 농도가 매우 낮기 때문에 이 시스템에 의한 1-hydroxyethyl이나 hydroxyl radical생성은 그리 대단치 않을 것으로 볼 수 있다. 그러므로 심장에서의 자유라디칼의 생성기전은, 단기 또는 장기에탄올 투여에 의해 심장의 NAD<sup>+</sup>-dependent xanthine dehydrogenase(XDH)가 oxygen-dependent xanthine oxidase(XO)형으로 전환되어 superoxide anion의 생성이 증가되기 때문이며 이것이 지질과산화에 기여한다고 보고되었다<sup>10)11)</sup>.

그러나 에탄올을 섭취한 동물의 조직내 지질 과산화물의 함량은 산소라디칼이 생성되는 potential과, 산소라

디칼과 과산화물을 제거하여 세포를 보호하려는 항산화 체계의 능력간의 균형에 따라 달라지므로 이러한 체계의 비교연구가 더욱 중요할 것이다.

심장근육의 superoxide dismutase(SOD)활성은 간에 비해 농도 낮고, catalase와 non-selenium dependent glutathione peroxidase(GPx) 활성도 낮다. 또한 glutathione 함량도 적으며 산화형 glutathione의 수송능력도 낮다. 따라서 심장근육은 이와같은 효소적 항산화 방어계가 간에 비해 잘 발달되어 있지 않기 때문에 산소라디칼에 대하여 더욱 민감할 것으로 추정된다.

에탄올 대사 과정에서 과량의 산소라디칼이 생성되어 조직내 산화 스트레스가 증가되면 세포막의 주 구성성분인 불포화지방산의 과산화가 일어나고 그에 따른 심근조직의 산화적 손상이 야기되어 생체막의 손상을 초래하게 될 것이라는 보고가 있었다<sup>24)</sup>. 그러나 본 연구에서는 식이열량의 36%를 공급하는 양의 에탄올을 6 주간 투여한 흰쥐의 심장에서, hydrogen peroxide와 hydroperoxide를 환원하여 제거함으로써 세포막을 보호하는 catalase의 활성은 증가하였으나(p < 0.05, Fig. 2), glutathione peroxidase(GPx) 활성에는 변화가 없었다(Table 2).

Hydrogen peroxide는 그 자체가 cytotoxic effect의 원인이 되고 강력한 hydroxy radical원으로 제공되는데 이 hydrogen peroxide의 해독이 앞서 언급한 두 효소에 의해 이루어지며, hydrogen peroxide에 대한 catalase의 Km은 1mM 이고, GPx의 Km은 약 1 $\mu$ M 정도이므로<sup>25)</sup>, 심장근육내에서 에탄올 섭취에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도가 높을때에는 hydrogen peroxide에 대한 친화력이 낮은 catalase가 더 유효하게 작동할 수 있을 것이다. Catalase는 여러 알코올, 특히 methanol에 노출된 미생물과 효모에서도 유도되었다<sup>26)27)</sup>.

본 연구에서 나타난 에탄올처리에 의한 catalase 활성 증가는 이전의 보고<sup>12)28)29)</sup>와도 일치하며, Fahimi 등<sup>30)</sup>은 본 실험과 같은 조건에서 에탄올로 5주간 처리하였을 때 심장의 catalase 활성이 유의적으로 증가하였고 이 상태는 18주간 계속되었다고 보고하였다. 한편, Radi 등<sup>31)</sup>은 쥐를 catalase 저해제인 aminotriazole로 처리하여 catalase활성과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소비가 80~90% 감소된 심장 미토콘드리아는 대조군에 비해 지질과산화에 더 민감하므로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 독성으로 부터 심장의 미토콘드리아를 보호하기 위해서는 catalase가 중요하다고 보고하였다.

Catalase에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated ethanol peroxidation 율은 catalase 양 그 자체보다는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성에 의해 주로 제한된다고 한다<sup>32)</sup>. 이는 심장의 미토콘드리아가 간에 비해 상대적으로 많은 양의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하

먼저도 심장의 catalase는 적은양 존재해 심장에서의 에탄올 대사와 관련해 상당히 중요한 역할을 할 것으로 보는 견해<sup>3)</sup>와도 일맥상통하는 것이라 하겠다. 따라서 에탄올 장기섭취에 의한 심근조직 중 catalase 활성의 증가는 에탄올 대사과정에서 초래되는 과량의 hydrogen peroxide를 처리하는데도 중요할 뿐만 아니라, 에탄올 대사를 보완한다는 점에서도 생체를 보호하는 중요한 항산화적 적응기전중의 하나라고 할 수 있겠다. Catalase 활성과는 다르게 GPx 활성은 에탄올을 처리한 쥐의 심장에서 변화가 없었으며 이는 이전의 보고와 일치한다.<sup>33)34)</sup>

Glutathione reductase(GR)는 glutathione peroxidase에 의해 생성된 산화형 glutathione(GSSG)을 NADPH를 사용하여 환원형 glutathione(GSH)으로 환원시키는 역할을 담당한다. 본 연구에서 심근 세포질의 glutathione reductase 활성도는 군 간 유의적인 차이가 없었으나 NADPH 생성에 중요한 glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성은 에탄올 섭취군에서 유의적으로 감소하였다(Table 2). Szweda 등<sup>35)</sup>은 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 지질과산화물인 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)과 함께 incubation하면 이 효소의 활성이 손실되는데 이는 이 효소의 glucose-6-phosphate 결합부위인 lysine 잔기의  $\epsilon$ -amino기와 HNE의 이중결합(C3)이 반응하기 때문이라고 보고하였다. 본 연구에서는 HNE 함량을 직접 측정하지는 않았으나 에탄올 장기섭취가 지질과산화를 초래하고 이로부터 파생된 HNE 생성의 증가가 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 불활성화하여 그 전체적 활성이 감소되었다고 볼 수 있을 것이다. 이와같이 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성이 감소하면 NADPH 공급이 제한되므로 결국 glutathione reductase에 의한 산화형 glutathione의 환원율이 상대적으로 줄어들어, 세포는 산화적 손상에 대해 취약해질 수 밖에 없을 것으로 사료된다.

Glutathione transferase는 glutathione을 이용하여 cytotoxic aldehyde와 adduct를 형성하여 세포 손상을 방지하는데 심장세포질의 glutathione transferase 활성은 에탄올 장기 투여에 의해 유의한 감소가 있었다( $p < 0.05$ , Table 2). 즉, 조직내 산화적 스트레스가 증가한 조건에서 세포는 많은 양의  $H_2O_2$ 나 organic hydroperoxide를 처리해야 하는데 glutathione transferase 활성의 감소는 이러한 독성과산화물의 처리능을 저하시켜 결국 세포막을 보호하는 능력이 감소되고 에탄올 장기 섭취 후 조직내 과산화 지질의 함량이 증가되는 결과로 나타났다.

Choy 등<sup>36)</sup>은 분리된 쥐의 심장에서 에탄올이 인지질

대사를 방해하며, perfusion시  $\alpha$ -tocopherol을 첨가함으로써 이를 방지할수있었다고 보고하였고, Redetzki<sup>37)</sup>는 생쥐에서 비타민 E가 에탄올에 의한 cardiotoxic effect를 방지할수 있다고 보고하였다.

그러나 본 연구에서 사용한 Lieber-DeCarli 액체 식이는 비타민 E가 권장량(0.45 IU/day/rat)에 비해 과량(30 IU/l diet, 1.8 IU/day/rat(1일 섭취량이 60ml일 경우)) 함유되어 있으므로 비타민 E가 충분하다 하더라도 에탄올 장기 섭취가 심근조직내 과산화지질함량을 증가시키고 여러가지 항산화효소계의 활성을 변화시킬 수 있음을 보여 주었다. 따라서 이러한 효과는 비타민 E 부족이 아닌 에탄올 자체에 의한 결과라고 볼 수 있겠다.

결론적으로, 에탄올처리에 의해 심근조직 중 지질의 과산화정도가 증가하였으며 아울러 항산화효소계도 변화하였다. 즉 glutathione transferase활성을 저해하여 해독기능을 저하시키고, glucose-6-phosphate dehydrogenase활성의 감소로 NADPH 공급을 저하시키므로써 환원성 glutathione의 확보를 어렵게 하였다. 그러나 증가된 catalase 활성은 심장의 지질과산화 증가를 충분히 방지하지는 못하였지만, 에탄올 장기투여에 의해 심장조직에 초래되는 산소라디칼에 의한 보다 심각한 손상으로부터 쥐의 심장을 보호하기 위한 항상성 적응 기전(homeostatic adaptation mechanism)의 하나로 작용하였다고 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 장기 에탄올 투여에 의한 심근조직의 산소라디칼성 조직 손상의 결과를 비교 분석하고, 이러한 손상을 방지하여 생체를 에탄올 유래 산소라디칼성 조직 손상으로부터 보호하는 효소계의 변화를 밝혀 산화성 조직손상 결과와 관련시켜 보고자 하였다.

체중 120~180g의 Spargue-Dawley 수컷 에탄올군에게 Lieber-DeCarli 액체 실험 식이를 통해 총 열량의 36%에 해당하는 양의 에탄올을 투여하였고 pair-fed 대조군에게는 에탄올 대신 같은 열량의 dextrin-maltose를 함유한 액체 식이를 6주 동안 공급한 후 단두로 희생시켜 수행한 본 연구의 결과는 다음과 같다.

에탄올이 초래하는 심근조직 병변의 병리기전을 알아보기 위해 측정된 산소라디칼 유래 조직의 산화성 손상 지표중의 하나인 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 심근내 함량은 유의적으로 증가되어( $p < 0.01$ ), 쥐 심근조직이 장기 에탄올투여에 의하여 산화성 손상을 받고 있음이 나타났다. 한편, 심근조직의 항산화 효소계에서 catalase활성은 장기에탄올 투여에

의해 유의적으로 증가하였으나( $p < 0.05$ ), glutathione 이용계 효소인 glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성은 에탄올 투여에 의해 변화가 없었고, glutathione transferase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성은 감소하여(각각  $p < 0.05$ ), glutathione 이용계의 기능저하가 catalase 활성 증가에도 불구하고 심근조직에서 에탄올 유래 산화성손상이 나타나게 된 주요 요인인 것으로 사료된다.

결론적으로, 장기 에탄올 투여는 심근조직에 산화성 손상을 일으키며, 이러한 산소라디칼에 의한 심근조직손상은 산화방어효소계활성의 불균형적 변화에 기인하는 것으로 나타났다.

■ 감사의 글

본 연구는 한국 건강과학연구재단과 교육부 학술진흥재단의 지원에 의하여 이루어졌음.

Literature cited

- 1) Thompson JA, Hess ML. The oxygen free radical system : Fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 28 : 449-462, 1986
- 2) Nakaya H, Tohse N, Kanno M. Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. *Am J Physiol* 253 : H1089-H1097, 1987
- 3) Edes I, Toszegi A, Csanady M, Bozoky B. Myocardial lipid peroxidation in rats after chronic alcohol ingestion and the effects of different antioxidants. *Cardiovasc Res* 20 : 542-548, 1986
- 4) Antonenkov VD, Pirozhkov SV, Popova SV, Panchenko LF. Effect of chronic ethanol, catalase inhibitor 3-amino-1, 2,4-triazole and clofibrate treatment on lipid peroxidation in rat myocardium. *Int J Biochem* 21 : 1313-1318, 1989
- 5) Panchenko LF, Pirozhkov SV, Popova SV, Antonenkov VD. Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart. *Experientia* 43 : 580-581, 1987
- 6) McCord JM. Free radicals and heart disease. In : Somigyi JC, Muller HR, eds. Nutritional Impact of Food Processing, pp.327-337, Basel, Karger, 1989
- 7) Garcia-Bunuel L. Lipid peroxidation in alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *Med Hypothesis* 13 : 217-231, 1984
- 8) Reinke LA, Lai EK, Du Bose CM, McCay PB. Reactive free radical generation in vivo in heart and liver of ethanol-fed rats : Correlation with radical formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 84 : 9223-9227, 1987

- 9) Reinke LA, Lai EK, McCay PB. Administration of ethanol or acetaldehyde to rats results in the generation of free radical in liver, heart, and other organs. In : Kuriyama K, Takada A, Ishii H, eds. Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism, pp.663-670, Oxford : Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, 1988
- 10) Oei HHH, Stroo WE, Burton KP, Schaffer SW. A possible role of xanthoxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol-treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38 : 453-461, 1982
- 11) Oei HHH, Zoganas C, McCord JM, Schaffer SW. Role of acetaldehyde and xanthine oxidase in ethanol-induced oxidative stress. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 51 : 195-203, 1986
- 12) Antonenkov VD, Panchenko LF. Effect of chronic ethanol treatment under partial catalase inhibition on the activity of enzymes related to peroxidemetabolism in rat liver and heart. *Int J Biochem* 20 : 823-828, 1988
- 13) Lieber CS, DeCarli LM. Animal models of chronic ethanol toxicity. In : Parker L, ed. Methods in Enzymology, vol. 233, pp.233 : 583-594, Academic Press Inc., New York, 1994
- 14) Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86 : 271-278, 1978
- 15) Levine RL, Carland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In : William BJ, ed. Methods in Enzymology, vol. 186, pp.464-478, Academic Press Inc., New York, 1990
- 16) Aebi H. Catalase in vitro. In : William BJ, ed. Methods in Enzymology, vol. 105, pp.121-126, Academic Press Inc., New York, 1984
- 17) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In : Fleisher S, Parker L ed. Methods in Enzymology, vol. 52, pp.506-513, Academic Press Inc., New York, 1978
- 18) Carberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. In : Fleisher S, Packer L. ed. Methods in Enzymology, vol. 113, pp.484-490, Academic Press Inc., New York, 1985
- 19) Löhr WG, Waller HD. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In : Bergmeyer HU, ed. Method of Enzymatic Analysis, 2nd eds. pp.636-643, Academic Press Inc., New York and London, 1974
- 20) Harbig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139, 1974
- 21) Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 240-254, 1970
- 22) Lieber CS, Decarli LM. Reduced nicotinamide-adenine

- dinucleotidephosphate oxidase : Activity enhanced by ethanol consumption. *Science* 170 : 78-80, 1970
- 23) Reitz RC. A possible mechanism for the peroxidation of lipids due to chronic ethanol ingestion. *Biochim Biophys Acta* 380 : 145-154, 1975
  - 24) Comporti M. Lipid peroxidation : An overview. In : Poli G, Albano E, Dianzani MU, eds. *Free Radicals : From Basic Science to Medicine (Molecular and cell biology updates)*, pp.65-79, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993
  - 25) Misra HP. Generation of superoxide free radicals during the autoxidation of thiols. *J Biol Chem* 249 : 2151-2152, 1974
  - 26) Fukui S, Kawamotom S, Yasuhara S, Tanaka A. Microbody of methanol-grown yeast : Localization of catalase and flavin-dependent alcohol oxidase in the isolated microbody. *Eur J Biochem* 59 : 561-566, 1975
  - 27) Roggenkamp R, Sahn H, Hinkelmann W, Wagner F. Alcohol oxidase and catalase in peroxisomes of methanol-grown candida boidinii. *Eur J Biochem* 59 : 231-236, 1975
  - 28) Kino M. Chronic effects of ethanol under partial inhibition of catalase activity in the rat heart : Light and electron microscopic observation. *J Mol Cell Cardiol* 8 : 22A-32A, 1986
  - 29) Burk RF. Recent development in trace element metabolism and function : newer roles of selenium in nutrition. *J Nutr* 119 : 1051-1054, 1989
  - 30) Fahimi HD, Kino LH, Thorp KA, Abelman WH. Increased myocardial catalase in rats fed alcohol. *Am J Pathol* 96 : 373-390, 1979
  - 31) Radi R, Bush KM, Freeman BA. The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 300 : 409-415, 1993
  - 32) Thurman RG, Scholz R. The role of hydrogen peroxide and catalase in hepatic microsomal oxidation. *Drug Metab Dispos* 1 : 441-448, 1973
  - 33) Ribiere C, Hininger I, Rouach H, Nordmann R. Effects of chronic ethanol administration on free radical defence in rat myocardium. *Biochem Pharmacol* 44 : 1495-1500, 1992
  - 34) Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* 65 : 128-135, 1980
  - 35) Szweda LI, Uchida K, Tasi L, Stadtman ER. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. *J Biol Chem* 268 : 3342-3347, 1993
  - 36) Choy PC, Man RYK, Chan AC. Phosphatidyl choline metabolism in isolated rat heart : Modulation by ethanol and vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1005 : 225-232, 1989
  - 37) Redetzki JE, Griswold KE, Nopajaroonsri C, Redetzki HM. Amelioration of cardiotoxic effects of alcohol by vitamin E. *J Toxicol Clin Toxicol* 20 : 319-331, 1983