

Ethanol을 전처치한 흰쥐의 간 및 혈청 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 Bromobenzene의 영향

윤종국·임영숙*

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

* 대구공업전문대학 식품영양과

Effect of Ethanol Pretreatment on the Serum and Liver Xanthine Oxidase Activity in Bromobenzene-Treated Rats

Chong-Guk Yoon and Young-Suk Lim*

Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

** Dept. of Food and Nutrition Taegu Technical Junior College*

ABSTRACT

To evaluate the effect of ethanol pretreatment on the liver and serum xanthine oxidase(XO) activity, the bromobenzene(400mg/kg body wt., i.p.) was orally given 3 times daily to the Sprague-Dawley male rats pretreated with 5% ethanol throughout 2 months. Bromobenzene treated rats pretreated with ethanol showed the more decreased activity of serum and liver XO, and lower value of V_{max} than those of only bromobenzene treated rats. By the bromobenzene treatment, ethanol pretreated rats showed the more decreased levels of serum alanine aminotransferase activity and liver weight/body weight(%), and decreased degree of liver damage on histopathological observation than the control group.

Key words: Bromobenzene, Ethanol, Xanthine oxidase.

I. 서론

최근 산업발전에 따른 유해공해물질의 인체 노출에 식생활 향상으로 주류의 소비량이 증가되면서 인간의 건강에 문제가 제기되고 있다. 이들 유해공해물질 중 xenobiotics의 일종인 bromobenzene은 산

업장의 산업공정에서 생성된 부산물 뿐만 아니라 유기용제로 사용되며 인체에 노출시 간조직세포의 다기능 복합효소기구에 의하여 bromobenzene 3,4-oxide로 전환되어지며 이 친전자성 free radical이 간독성을 야기시킨다¹⁾. 이같은 xenobiotics와 알코올과의 상호작용에 대해서는 오래 전부터 연구의 대상^{2~4)}이 되어왔다.

Xanthine oxidase (EC. 1.2.3.2; XO)는 purine 체, aldehyde류 및 heterocyclic compound의 대사에 관여하는 효소로서⁵⁻⁷⁾ virus⁸⁾, 세균⁹⁾, 기생충¹⁰⁾의 감염과 사염화탄소⁴⁾, bromobenzene¹¹⁾과 toluene¹²⁾ 같은 xenobiotics성 중독에 의한 간 손상시에 혈청 중 그 활성이 증가된다고 하며, 특히 급·만성 알코올중독시 본 효소 활성 변동에 대해서는 논란의 대상이 되어왔다. 또한 XO는 생체내에서 xenobiotics 대사생성물질에 의한 세포상해에 따른 oxygen free radical 생성에 관여하는 생체 방어기구와 관련된 효소로도 알려져 있다⁹⁾. 더우기 알코올을 장기간 음용시 생체 방어 능력이 떨어짐은 주지의 사실이다. 따라서 만성알코올 중독은 xenobiotics의 대사에 영향을 미칠 것으로 생각되며 이로 인하여 xanthine oxidase 효소기구에도 간접적인 영향을 받을 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 실험동물에 알코올을 장기간 음용시킨 후 간 무게, 혈청 ALT, 간조직 중 단백질 함량 측정과 병리조직검사를 통하여 간 손상 정도를 확인함과 동시에 이러한 실험동물 모델에 bromobenzene을 투여한 뒤 혈청 및 간조직 중 xanthine oxidase 활성을 측정하여 이들 실험 결과를 비교 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물의 사육조건 및 처치

체중 200g 내외의 Sprague-Dawley 종 숫흰쥐를 물대신에 5% ethanol을 음용시키면서 25°C에서 2개월간 사육시켰으며 대조군은 물만 먹도록 하였다. 이때 사료는 삼양사 동물식이를 사용했다. 이 기간 동안 사육시킨 300g 내외의 흰쥐에 bromobenzene을 체중 100g당 400mg을 1일 간격으로 3회 투여한 뒤 대조군과 함께 12시간 절식시킨 후 처치하였다. 실험동물은 대조군, ethanol 투여군, bromobenzene 투여군 및 ethanol 전처치 후 bromobenzene 투여군, 모두 4개군으로 하였다.

동물 처치는 ether 마취하에서 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사시킨 다음 4°C의 생리식염수로 관류하여 간에 남아

있는 혈액을 제거한 후 간을 적출하였다. 적출한 장기를 생리식염수로 장기 표면에 묻은 혈액을 가볍게 씻은 후 장기내 생리식염수를 가능한 모두 제거한 뒤 간 무게를 칭량하였다.

한편 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 xanthine oxidase(XO) 및 alanine aminotransferase(ALT) 활성 측정에 사용하였다.

2. 효소원의 조제

적출한 간장 일부에 1g당 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가하여 빙냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액(20% W/V)을 refrigerated centrifuge(Hitachi, SCR20BB 및 70P-72)를 사용하여 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 그 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 분리하였다. Cytosol 분획은 XO 활성의 측정에 사용하였다.

3. 혈청 Alanine aminotransferase(ALT) 활성 측정

혈청 ALT 활성측정은 Reitman-Frankel의 방법¹³⁾에 준해 조제된 kit시액을 사용하였다. 활성도 단위는 혈청 ml당 Karmen unit¹⁴⁾로 표시하였다.

4. 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성 측정

간조직의 XO 활성 측정은 Stirpe와 Della Corte의 방법¹⁵⁾, 혈청은 Yoon의 방법¹⁶⁾에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직에서는 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로, 혈청에 있어서는 생성된 uric acid 양을 혈청 1/당 μmole로 표시하였다.

간조직 XO의 반응속도는 효소시료를 일정하게 하고 pH 8.0에서 xanthine의 농도를 변화시키면서 효소활성을 측정하여 double reciprocal plot로 나타내어 V_{max} 와 K_m 치를 계산하였다.

5. 간조직 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법¹⁷⁾에 의해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

6. 간조직의 광학현미경적 관찰

10% formalin에 고정된 조직편을 paraffin에 포매하여 4 μ m의 두께로 박절하고 hematoxylin-eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 성적 검정

실험 성적의 통계처리는 student's t-test¹⁸⁾를 이용하여 상호 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성변동

Fig. 1은 실험동물을 2개월간 5% ethanol을 음용시킨 후 bromobenzene 투여시 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성을 나타낸 것이다.

알코올을 전처치한 실험동물의 간 xanthine oxidase 활성은 대조군보다 약 47%의 유의한 증가를 보였으며 이는 타 연구자들의 보고와 유사하였다. 특히 bromobenzene 투여시 간조직 중 본 효소 활성이 대조군보다 약 25%의 유의한 증가를 보였으나 ethanol 전처치하므로써 다소 감소되었다.

한편 혈청 xanthine oxidase 활성 역시 bromobenzene 투여군이 대조군보다 약 94%의 유의한 증가를 보였으나 ethanol 전처치하므로써 약 14% 감소되었다. 따라서 실험동물에 bromobenzene 투여시 ethanol 전처치하므로써 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성이 오히려 감소되었다.

CCl₄⁴⁾, bromobenzene¹¹⁾, toluene¹²⁾과 같은 xenobiotics의 간 중독시 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성이 증가되며 이때 간 손상 정도에 비례해서 본 효소활성이 증가된다고 한다. 따라서 본 실험 조건에서 ethanol 전처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군의 간 손상 정도를 bromobenzene만 투여한 경우와 비교 검토하는 것이 의의가 있으리라 생각된다.

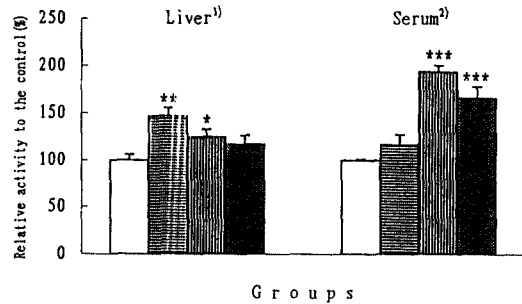


Fig. 1. Effect of ethanol pretreatment on the liver and serum xanthine oxidase activity in bromobenzene-treated rats. The assay procedure was described in experimental methods.

Each value represents the mean \pm S. E. of 6 rats.

Significantly different from the control group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$)

Unit: ¹⁾ n moles uric acid formed/mg protein/min, ²⁾ μ moles uric acid formed/l of serum/min and described as relative activity to the control

□: Control, ▤: Ethanol, ▥: Bromobenzene, ▧: Ethanol+Bromobenzene

2. Ethanol 전처치한 실험동물에 bromobenzene 투여가 간 손상에 미치는 영향

흰쥐에 5% 알코올을 60일 동안 음용시킨 후 체중당 간 무게, 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 활성 및 간세포질성 단백질 함량은 대조군에 비하여 별다른 차이를 볼 수 없었다(Fig. 2). 또한 병리조직검사에서 두 군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다(Fig. 3 참조). 이와 같은 ethanol 전처치한 실험동물 모델에 bromobenzene을 투여한 경우에 bromobenzene만 투여한 실험군보다 체중당 간 무게는 별다른 차이를 볼 수 없었으나 혈청 ALT 활성은 약 50%의 유의한 감소를 보였다. 그리고 간 손상시 그 함량이 감소된다는 간조직 중 단백질 함량¹⁹⁾은 ethanol 전처치하므로써 오히려 증가되는 경향을 보였다(Fig. 2).

한편 bromobenzene만 투여한 실험군에서 병리조

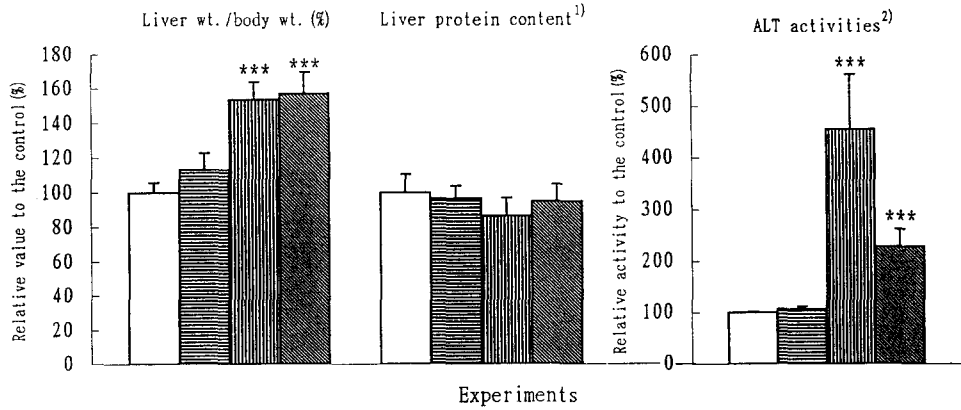


Fig. 2. Effect of ethanol pretreatment on the liver weight per body weight (%), liver protein content and serum levels of ALT activity in bromobenzene-treated rats. The assay procedure was described in experimental methods. Each value represents the mean \pm S. E. of 6 rats. Significantly different from the control group (***) : $p < 0.001$. Unit: ¹⁾ mg / g of liver wt., ²⁾ karmen unit / ml of serum and described as relative activity to the control. □: Control, ▨: Ethanol, ▩: Bromobenzene, ▪: Ethanol+Bromobenzene.

작 소견은 zonal necrosis가 관찰되었으나 ethanol 전처치군은 mild necrosis 정도가 관찰되었다(Fig. 3).

Ethanol 전처치 후 bromobenzene 투여시에 bromobenzene 대사가 오히려 촉진된다는 최근 윤 등의 보고¹⁹⁾를 고려해 볼 때, bromobenzene 투여시

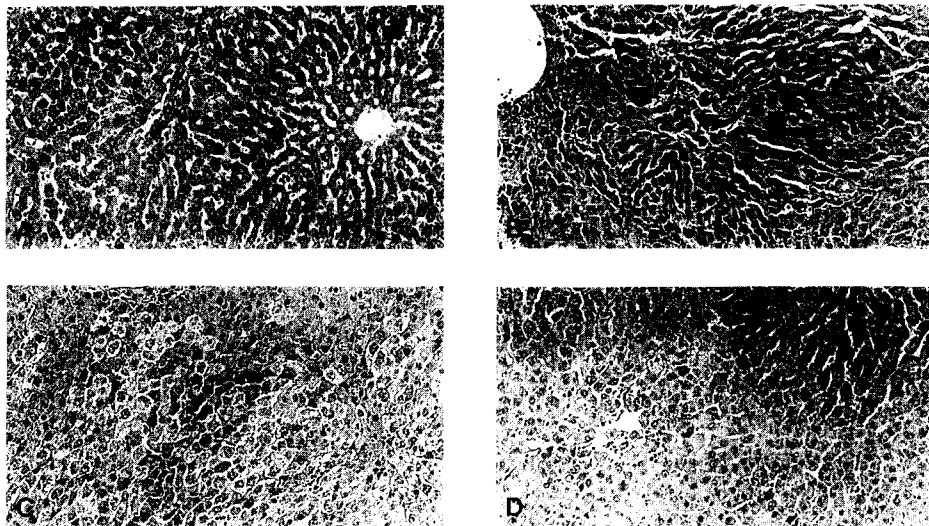


Fig. 3. Photomicrographs of hepatic tissue in rat (Hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).
 A. Control group. The hepatic parenchyma is well preserved.
 B. Ethanol group. The hepatocytes are seen mild pyknotic changes.
 C. Bromobenzene group. The hepatocytes show zonal necrosis and occasionally coagulative.
 D. Ethanol+Bromobenzene group. Disarray of centrilobular hepatocytes, which consist of hepatocytic swelling and minate necrosis.

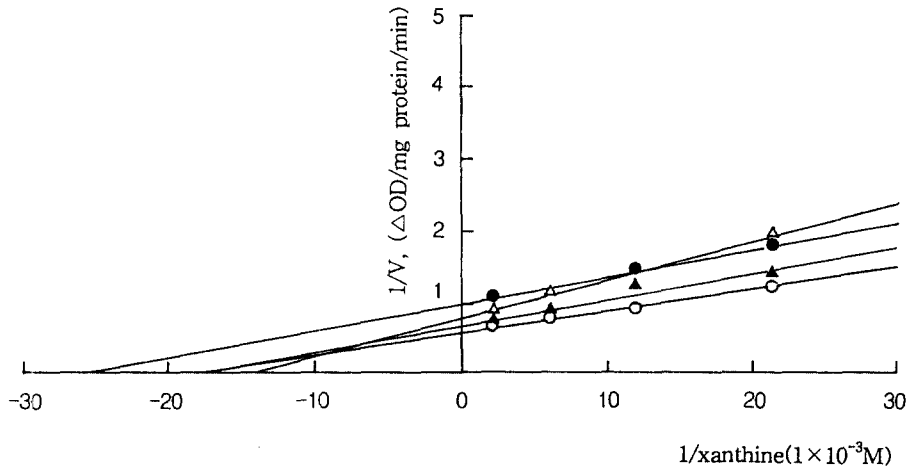


Fig. 4. Double reciprocal plots of hepatic xanthine oxidase with xanthine as a substrate in control, ethanol, bromobenzene and ethanol pretreated-rats.

The assay mixture consists of various concentration of xanthine, 0.15M potassium phosphate buffer (pH 8.0), 0.1 ml of pooled liver supernatant (2mg of protein) in a final volume of 3.0ml. Values are means for 3 experiments.

●-●; Control, ○-○; Ethanol, ▲-▲; Bromobenzene, △-△; Ethanol+Bromobenzene.

ethanol 전처치하므로서 간 손상이 경미하게 나타남은 bromobenzene 대사 촉진으로 간 독성을 야기시키는 것으로 알려져 있는 bromobenzene의 중간 생성물질인 bromobenzene 3,4-oxide의 체외로의 배설촉진에 기인된 결과로 생각된다. 이와 같이 bromobenzene 투여시 ethanol 전처치하므로서 bromobenzene만 투여한 실험군보다 간 손상이 경미하게 나타나므로서 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성이 bromobenzene만 투여한 군보다 낮게 나타난 결과로 생각된다.

3. 기질변동에 따른 간조직의 xanthine oxidase의 반응속도

윤 등은 CCl_4 와 같은 xenobiotics성 간 손상시에 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성증가는 효소단백 합성유도에 기인된다고 보고²⁰⁾하였다. 따라서 본 실험에서 bromobenzene 투여시 ethanol 전처치하므로서 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성 감소의 기전을 규명코자 기질의 농도를 달리하면서 간 xanthine oxidase 활성변동을 측정하여 Fig. 4와 같이

double reciprocal plot를 나타냈다.

Ethanol 투여군은 V_{max} 치가 대조군에 비하여 약 1.7배 증가되었으며, K_m 치는 약 1.5배 증가되었다. 특히 bromobenzene 투여시 ethanol을 전처치하므로서 V_{max} 치는 약 17% 감소되었으며, K_m 치는 약 16% 증가되었다. 따라서 bromobenzene 투여시 ethanol 전처치하므로서 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성이 감소된 결과는 본 효소 단백질합성유도 저하에 기인됨과 더불어 기질과 본 효소와의 친화성이 낮게 나타난 결과로 생각된다.

IV. 요약 및 결론

흰쥐에 bromobenzene 투여시 ethanol 전처치가 간 및 혈청 중 xanthine oxidase(XO) 활성 변동에 어떠한 영향을 미치는지를 알아 볼 목적으로 흰쥐에 5% ethanol을 2개월간 음용시킨 후 bromobenzene을 투여한 다음 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Bromobenzene 투여시 간 및 혈청 중 XO 활성이

유의한 증가를 보였으며, ethanol을 전처리하므로써 본 효소 활성의 증가율이 bromobenzene만 투여한 실험군에 비하여 오히려 낮게 나타났다.

또한 bromobenzene 투여시 혈청 ALT 활성 증가율이 ethanol을 전처리하므로써 낮게 나타남과 동시에 병리조직학적 소견에서도 간 손상이 경미하게 나타났다. 간 XO 효소의 반응속도를 관찰한 결과 ethanol 전처리후 bromobenzene을 투여한 경우에 bromobenzene만 투여한 실험군보다 V_{max} 가 낮게 나타났다. 이상 실험결과를 종합해 볼 때 bromobenzene 투여시 ethanol을 전처리하므로써 간 및 혈청 XO활성의 감소현상은 간 손상이 경미하게 나타남과 더불어 본 효소 합성유도에 영향을 받음으로서 야기된 결과로 생각된다.

V. 참고문헌

- Zheng, J. and Hanzlik, R. P. : Premercapturic acid metabolism of bromobenzene derived via its 2,3-and 3,4-oxide metabolites. *Xenobiotica*, 21(4) : 535-546, 1991.
- Traiger, G. J. and Plaa, G. L. : Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CCl_4 hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 183: 481-488, 1972.
- Strubelt, O. : Interactions between ethanol and other hepatotoxic agent., *Biochem. Pharmacol.*, 29: 1445-1449, 1980.
- 윤종국, 김병렬, 이상일 : Ethanol을 전처리한 흰쥐의 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성에 미치는 사염화탄소의 영향, *한국환경위생학회지*, 19(2) : 69-77, 1993.
- Krenitsky, T. A. : Xanthine oxidase and aldehyde oxidase in purine and purine analogue metabolism, *Exp. Med. Biol.*, 41: 57, 1973.
- Ramber, C. R. H. : A sensitive and non-radioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 74: 828, 1969.
- Duke, E. J., Joyce, P. and Ryan, J. P. : Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse, *Biochem. J.*, 131: 187, 1973.
- Ziegler, D. W., Hutchinson, H. D. and Kissling, R. E. : Induction of xanthine oxidase by virus infections in new born mice, *Infection and Immunity*, 3(2) : 237-242, 1971.
- Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Gorce, C. : Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes, *Arzneim Forsch. (Drug Res.)*, 26(12) : 2185-2186, 1976.
- Crosby, P. E., Matos, M. L. and Rivera-Collazo, E. : Liver xanthine oxidase activity of mice infected with *Schistosoma mansoni*, *J. Parasit.*, 55: 673, 1969.
- 윤종국 : 저 및 표준단백식이로 성장시킨 흰쥐에 bromobenzene 투여가 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향, *연구논집(계명대학교 기초과학연구소)*, 15(2) : 305-312, 1996.
- 전태원, 강희양, 윤종국 : 흰쥐에게 toluene 투여가 혈청 xanthine oxidase 활성변동에 미치는 영향. *한국독성학회지*. 11(2) : 279-288, 1995.
- Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. Pathol.*, 28: 58-63, 1957.
- Karmen, A. : A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum, *J. Clin. Invest.*, 34: 131-133, 1955.
- Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 244(14) : 3855-3863, 1969.
- Yoon, C. G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts,

- Keimyung Research Journal(Keimyung Junior College), 2: 295-308, 1984.
17. Lowry, O. H., Rosenbrough, M. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
 18. Scheffler, W. C.: Statistics for the biological sciences, ed. 2. USA, Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company: pp. 84-89, 1980.
 19. 김중우, 신중규, 윤종국: 흰쥐에 있어서 주정 중독이 bromobenzene 대사에 미치는 영향, 한국독성학회지, 11(2): 253-259, 1995.
 20. 윤종국, 이상일, 신중규: 식이성 단백질 함량에 따른 흰쥐에 CCl_4 투여가 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향, 한국영양식량학회지, 20(6): 527-537, 1991.