

## 태생 및 수유기에 알코올에 노출된 신생 흰쥐의 Liver Microsomal Mixed Function Oxidase System과 Lipid Peroxidation의 변화

이화여자대학교 의과대학 생화학교실  
홍 영 숙 · 함 윤 애  
이화여자대학교 의과대학 해부학교실  
이 회 래

= Abstract =

### Study on Mixed Function and Lipid Peroxidation of Neonatal Hepatic Microsomes after Exposure to Alcohol During the Fetal and Lactating Period

Young Sook Hong · Yoon Ae Ham

*Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University*

Hee Lai Lee

*Department of Anatomy, College of Medicine, Ewha Womans University*

Maternal ingestion of alcohol produce not only change of drug metabolism but also proliferation of hepatic smooth endoplasmic reticulum and many developmental defects of the central nervous system.

The present investigation examined the effects of maternal consumption of alcohol during pregnancy and/or lactation the activities of electron transfer components, mixed function monooxygenase, UDP-glucuronosyltransferase and lipid peroxidation of neonatal rat liver microsomes.

Normal group consisted of neonatal rats whose mothers received standard chow and water. The subject of experimental group were neonatal rats whose mothers were exposed to alcohol during pregnancy and lactation(3 weeks).

The results were obtained as follows :

The activities of the electron transfer system, such as cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase were increased in hepatic microsomes of experimental group.

The activities of the mixed function monooxygenase, p-nitroanise-O-demethylase and the conjugated enzyme, UDP-glucuronosyltransferase were increased in hepatic microsomal experimental group. There was no significant differences between the formation of lipid peroxide of normal and experime-

ntal group.

These results suggest that prenatal exposure to alcohol are influenced by disturb of liver microsomal drug metabolism, especially during the fetal period.

## 서 론

알코올은 오랜 역사와 함께 애용되고 있으나 건강에 해로울 뿐만 아니라 내 생화학 반응계에 여러가지 변화를 나타내는 매우 흥미있는 물질이다. 임신부의 음주는 알코올이 태반을 통하여 태아의 성장 발육의 방해와 기형을 일으키는 %요인으로 알려져 왔다<sup>1,2)</sup>. 그러므로 알코올이 태아의 중추신경계에 미치는 영향은 다양하게 보고되어 왔으나 알코올 투여 중 수유된 태아의 간조직 약물대사에 미치는 영향은 보고된 바 없다.

간조직내 약물, 발암물질 등 외인적인 물질 뿐만 아니라 내인적인 물질 steroid, fatty acid 등의 대사는 mixed function monooxygenase system에 의해 대사된다는 것은 잘 알려져 왔다<sup>3,4)</sup>. 간조직내 알코올 대사는 급성으로 알코올을 투여하면 약물대사를 억제하는<sup>5,6)</sup> 한편 만성적으로 알코올을 투여하면 간조직내 약물대사 효소 활성을 변화시킬 뿐만 아니라<sup>7,9)</sup> hepatic smooth endoplasmic reticulum 증식을 초래한다. 또한 간조직내 약물대사의 mixed function oxidase 성분인 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase 및 microsomal lipid의 양도 증가하게 된다<sup>10,12)</sup>.

태아의 발육과정에서의 세포 및 조직성장 분화는 매우 중요한 문제이며 이러한 과정에서 알코올 투여는 유해하다고 보고되었다<sup>13)</sup>. 본 연구는 알코올이 태아의 약물대사에 미치는 영향을 연구하기 위하여 임신 및 수유기에 알코올을 먹은 어미에서 태어난 신생 흰쥐의 간조직내 mixed function oxidase system, electron transfer system 및 lipid peroxidation 변화를 관찰하여 보고 하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### A. 실험동물

#### 1. 어미 흰쥐

정상조건으로 사육한 체중 250g 내외의 성숙한 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 교배하여 임신시켰다. 흰쥐의 교

배방법은 임신한 경험이 없는 암 흰쥐를 표준질 도말법에 의하여 발정기로 판정되면 숫 흰쥐와 동거시키고 다음날 오전에 질전(Vaginal plug)이 확인되면 이 날을 임신 제 1일로 산정하였다. 흰쥐들은 정상 흰쥐와 알코올을 먹는 흰쥐로 구분하여 사육하였다.

(1) 정상 흰쥐: 전체 임신기(평균 21일) 및 수유기(출산 후 3주간)에 규정사료 및 물을 자유롭게 공급하였다.

(2) 알코올을 먹이는 흰쥐: 임신 및 수유기에 규정사료를 자유롭게 공급 하였으며 임신 제 6~7일 부터 5% 알코올을 주기 시작하여 점차로 농도를 높여 임신 제 11일부터 출산까지는 12% 알코올을 주었고 수유기에도 12%의 알코올을 주었다(ad libitum).

#### 2. 신생 흰쥐

신생 흰쥐는 어미 흰쥐의 실험조건에 따라 대조군과 실험군으로 구별하여 비슷한 체중의 흰쥐를 각각 10마리씩 사용하였다.

(1) 대조군: 정상 흰쥐에서 출생하고 수유기에도 정상 흰쥐의 젖으로 성장하였다.

(2) 실험군: 알코올을 먹은 흰쥐에서 출생하고 수유기에도 알코올을 먹은 어미흰쥐의 젖을 먹고 성장하였다.

#### 3. 실험방법

각 실험군은 출생 3주일째 되는 날에 간조직을 절제하였다. 절제한 간조직은 0.25M-sucrose 용액으로 25% 균질용액을 만들어 microsome을 분리하였다. 단백질 측정은 Lowry 등의 방법<sup>14)</sup>으로 측정하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. Cytochrome P-450은 Omura와 Sato 방법<sup>15)</sup>으로 측정하였으며 이때 molar extinction coefficient는  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.  $b_{550}$ 함량은 molar extinction coefficient  $185\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 Smuckler 등의 방법<sup>16)</sup>으로 측정하였다. Lipid peroxidation 결과 생성되는 malondialdehyde 양은 thiobarbituric acid 방법<sup>17)</sup>으로 측정하였으며 molar extinction coefficient  $1.56 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 malondialdehyde 양을 계산하였다.

**Table 1.** The contents of electron transfer system of the normal neonatal rat and the neonatal rat exposed to alcohol during the fetal and lactating period

	Control	Alcohol
Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	2.29±0.24	2.92±0.38
NADPH-cytochrome C reductase (nmoles/mg protein/min)	28.26±1.07	34.25±3.04**
Cytochrome b <sub>5</sub> (nmoles/mg protein)	0.096±0.0025	0.110±0.0029*
NADH-cytochrome C reductase (nmoles/mg protein/min)	231.49±4.97	292.74±6.55*

Each value represents the mean±S.D. of 6 experiments.

\* Significantly different from control value P<0.01

\*\* Significantly different from control value P<0.05

NADPH-, NADH-cytochrome C reductase 함량은 Omura와 Takesue 방법<sup>18)</sup>을 사용하였으며 550nm의 흡광도 증가를 molar extinction coefficient 21.1 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 사용하여 계산하였다. p-Nitroanisole-O-demethylase 활성은 Netter와 Seidel 방법<sup>19)</sup>으로 측정하였으며 molar extinction coefficient는 14.5mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 사용하였다. UDP-glucuronosyltransferase 활성은 Is-selbacher 등의 방법<sup>20)</sup>으로 측정하였으며 molar extinction coefficient는 18.0mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 사용하였다.

### 실험 결과

1) 출생 후 3주간 성장한 신생 흰쥐 간조직내 mixed function oxidase system의 변화

표 1에서 보는 바와 같이 출생 후 3주간 성장한 신생 흰쥐의 간조직내 cytochrome P-450 함량은 2.92±0.38 nmoles/mg protein(이하 nmoles로 표시)으로 대조군 2.29±0.24 nmoles에 비해 증가하였으나 통계학적으로 의의는 없었다.

b<sub>5</sub> 함량은 대조군이 0.096±0.0025 nmoles이고 알코올 투여군이 0.110±0.0029 nmoles로 의의 있게 증가하였다(P<0.01). NADPH-cytochrome C reductase 활성도는 알코올 투여군이 34.25±3.04 nmoles로 대조군 28.26±1.07 nmoles에 비해 의의 있게 증가하였다(P<0.01). NADH-cytochrome C reductase 활성도도 알코올 투여군이 292.74±6.55 nmoles로 대조군 231.49±4.97 nmoles에 비해 의의 있게 증가하였다.

2) 출생 후 3주간 성장한 신생 흰쥐의 간조직내 mixed function oxidase 활성도의 변화.

표 2에서 보는 바와 같이 p-nitroanisole-O-demethylase 활성도는 대조군이 3.13±0.49 nmoles/mg protein/min(이하 nmoles로 표시)이고 알코올 투여군이 4.70±0.35 nmoles로 의의 있게 증가하였다(P<0.01).

3) 출생 후 3주간 성장한 신생 흰쥐의 간조직내 lipid peroxidation 변화

표 3에서 보는 바와 같이 대조군이 1.68±0.07 nmoles/mg/protein/min(이하 nmoles로 표시)였으며 알코올 투여군은 1.67±0.07 nmoles로 변화가 없었다.

4) 출생 후 3주간 성장한 신생 흰쥐의 간조직내 UDP-glucuronosyltransferase 활성도의 변화

표 4에서 보는 바와 같이 UDP-glucuronosyltransferase 활성도는 알코올 투여군이 1.395±0.264 nmoles/mg protein/min(이하 nmoles로 표시)로 대조군 0.448

**Table 2.** The activity of mixed function oxidase of p-nitroanisole of the normal neonatal rat and the neonatal rat exposed to alcohol during the fetal and lactating period

Group	p-nitroanisole-O-demethylase (nmoles/mg protein/min)
Control	3.13±0.49
Alcohol	4.70±0.35*

Each value represents the mean±S.D. of 6 experiments.

\* Significantly different from control value P<0.01

Table 3. Lipid peroxidation of the normal neonatal rat and the neonatal rat exposed to alcohol during the fetal and lactating period

Group	Lipid peroxide (nmoles/mg protein/min)
Control	1.68± 0.07
Alcohol	1.67± 0.07

Each value represents the mean± S.D. of 6 experiments.

Table 4. UDP-glucuronosyltransferase activity toward p-nitrophenol of the neonatal rat and the neonatal rat exposed to alcohol during the fetal and lactating period

Group	UDP-glucuronosyltransferase (nmoles/mg protein/min)
Control	0.448± 0.070
Alcohol	1.395± 0.264*

Each value represents the mean± S.D. of 6 experiments.

\* Significantly different from control value  $P < 0.001$

± 0.070 nmoles에 비해 현저히 증가하였다( $P < 0.001$ ).

## 고 찰

Rubin등은 알코올을 장기 투여하면 hepatic smooth endoplasmic reticulum과 cytochrome P-450, 이에 관련된 효소의 활성도가 증가한다고 하였다<sup>7)11-12)</sup>. Liu등은 알코올을 장기 투여할 때 약물대사효소에 미치는 영향은 복잡적이고 성별, 다른 이물질에 노출, 특히 중요한 것은 알코올 투여기간과 알코올 섭취량에 의한다고 보고하였다<sup>21)</sup>. Cytochrome  $b_5$ 는 microsomal NADH-dependent fatty acyl CoA desaturase 사이의 중간 electron carrier 역할을 한다<sup>22)</sup>. 또한 McCoy 등은 hamster에 알코올을 투여했을 때 microsomal stearyl CoA-desaturase activity 감소가 cytochrome  $b_5$  함량 감소를 수반하여 일어나며 NADPH-cytochrome C reductase 감소는 없었다고 보고한 바도 있다<sup>23)</sup>. 본 실험에서는 cytochrome P-450과 NADPH-cytochrome C reductase 그리고 cytochrome  $b_5$ , NADH-cytochrome C reductase의 electron transfer system의 활성도가 증가하는 것을 관찰하였다. 이는 임신과 수유기에 알코올 투여가 microsomal electron transfer system의 활성을 증가시킴을 확인할 수 있었다.

간장내 p-nitroanisole의 microsomal-O-demethylation

은 mixed function oxidase system이 관여하며 phenobarbital을 투여하면 O-demethylation이 증가한다<sup>19)</sup>. Reinke등은 붉은 흰쥐의 간장 microsome에 in vitro로 알코올을 투여하면 p-nitroanisole-O-demethylase가 증가됨을 보고하였다<sup>24)</sup>. 또 Gadeholt는 p-nitroanisole-O-demethylase 활성 측정이 cytochrome P-450 hemoprotein유도를 측정하는데 유용하게 사용할 수 있음을 보고하였다<sup>25)</sup>. 본 실험에서도 p-nitroanisole-O-demethylase를 측정된 결과 mixed function oxidase system의 활성도가 의의있게 증가하였다. 또한 알코올 투여가 태아 간장 손상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 lipid peroxidation을 측정하였다. lipid peroxidation은 polyunsaturated fatty acid의 산화적 분해과정으로 많은 xenobiotics의 독성은 이과정을 포함하고 있다. 알코올로 유도된 간장 손상시 lipid peroxidation이 수반되는지는 논쟁의 쟁점이 되어 왔다. 그러나 흰쥐에 짧은 기간 동안 알코올을 투여하여도 hepatic lipid peroxidation이 증가한다는 보고가 있으며<sup>26-28)</sup>, Shaw는 붉은 흰쥐에 알코올을 장기 투여하면 lipid peroxidation이 증가한다고 보고한 바 있다<sup>29)</sup>. 본 실험에서는 lipid peroxidation의 변화는 없었다. 이는 어미쥐에 태반을 통하여 흡수된 알코올은 신생 흰쥐의 간장 손상에 직접적인 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

UDP-glucuronosyl transferase는 endoplasmic reticulum에 존재하며 이물질(xenobiotics), 홀몬 및 bilirubin과 같은 내인성 물질을 UDP-glucuronic acid와 결합시켜서 비활성 물질로 제거시키는 중요한 과정이다<sup>30)</sup>. 흰쥐에 DDT(1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(p-chlorophenyl) ethane)을 투여하면 UDP-glucuronosyltransferase 활성도가 증가하며<sup>31)</sup>, 알코올을 투여하는 경우에는 UDP-glucuronic acid의 이용도를 감소시켜 gluouronide conjugation을 감소시킨다는 보고가 있다<sup>32)</sup>. Ideo등은 알코올에 의한 신생아의 hyperbilirubinemia를 방지하기 위해서는 microsomal UDP-glucuronosyltransferase를 유도시켜야 한다고 보고하였다<sup>33)</sup>. 그러나 Marniemi등은 phenobarbital과 3, 4-benzpyrene을 전처리한 liver microsome에서 in vitro로 ethanol을 투여하면 p-nitroanisole-O-demethylase 활성이 감소되고 알코올 농도가 낮을 때(2.4mol/l) UDP-glucuronosyltransferase 활성이 증가함을 보고하였다<sup>34)</sup>. 본 실험에서는 UDP-glucuronosyltransferase 활성이 증가함을 관찰하

였다. 이와같은 conjugation 효소의 유도는 제독성 반응의 조절에서 중요한 역할을 하게 된다. 출생하면서 알코올에 대한 독성작용에 대비하여 conjugation 효소가 유도되면서 제독성 반응이 조절된다고 생각된다.

## 결 론

임신 및 수유기에 알코올을 먹은 어미에서 태어난 신생 흰쥐의 간조직내 mixed function oxidase system, electron transfer system 및 lipid peroxidation을 측정 한 결과는 다음과 같다.

- 1) 알코올 투여군이 대조군보다 cytochrome P-450, b<sub>5</sub> 함량이 증가 하였고 NADPH-, NADH-cytochrome C reductase 활성이 증가되었다.
- 2) Mixed function oxidase 활성도는 알코올 투여군이 대조군보다 증가하였다.
- 3) Lipid peroxidation은 알코올 투여군에서 변화가 없었다.
- 4) UDP-glucuronosyltransferase 활성도는 알코올 투여군이 대조군보다 현저히 증가하였다.

## References

- 1) Avery ME and Taensch HW Jr : *Schaffer's diseases of the Newborn. 5th ed., Philadelphia, WB Saunders, 1984 : pp13*
- 2) Cloherty JP and Stark AR : *Manual of Neonatal care. 2nd ed., Boston/Toronto. Little Brown and company 1985 : pp590-591*
- 3) Wislocki PG, Miwa GT and Liu AYH : *Reactions of the cytochrome P-450 system. In Jacoby, WB(ed), Enzymatic basis of Detoxification. New York, Academic Press 1980 : 1 : pp135-182*
- 4) Conney AH : *Pharmacological implicastion of microsomal enzyme induction. Pharmac. Rav. 1967 : 19 : 317-366*
- 5) Rubin E & Lieber CS : *Alcoholism, Alcohol and drugs : Science 1971 : 172 : 1097-1102*
- 6) Rubin E, Gang H, Misra PS and Lieber CS : *Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication. Am J Med 1970 : 49 : 801-806*
- 7) Ribon E, Hutterer F and Lieber CS : *Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drugmetabolizing enzymes. Science 1968 : 159 : 1469-1470*
- 8) Winston GW and Reitz R : *Sex differences in the response of several lipogenic enzymes to chronic ethanol ingestion. Biochem Pharmacol 1978 : 28 : 1249-1255*
- 9) Hasumura Y, Teschke R and Lieber CS : *Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its mechanism, after chronic ethanol consumption. Gastroenterology 1974 : 66 : 415-422*
- 10) Rubin E, Lieber CS, Alvares AP, Levin W and Kuntzman F : *Ethanol binding to hepatic microsomes-Its increase by ethanol consumption. Biochem Pharmacol 1971 : 20 : 229-231*
- 11) Joly JG, Ishii H, Teschke R, Hasumura Y and Lieber CS : *Ethanol of chronic ethanol feeding on the activities and submicroosomal distributioni of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase and the demethylase for aminopyrine and ethylmorphine. Biochem Pharmacol 1973 : 22 : 1532-1535*
- 12) Ishii H, Joly JG and Lieber CS : *Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes. Biochim Biophys Acta 1973 : 291 : 411-420*
- 13) Warner RH and Rosett HL : *The effects of drinking on offspring : An historical survey of the American and british literature. J Stud Alcohol 1975 : 36 : 1395-1420*
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RT : *Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 : 193 : 265-275*
- 15) Omura T and Sato R : *Carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. J Biol Chem 1964 : 239 : 2370-2378*
- 16) Smuckler EA, Arrhenius E and Hulton T : *Alteractions of microsomal electron transport, oxidative N-demethylation and azo-due in carbon tetrachloride and demethylnitrosoamine-induced liver injury. Biochem J 1967 : 103 : 55-64*
- 17) Buege JA and Aust SD : *Microsomal lipid peroxidation. Method. Enzymology 1978 : 52 : 302-310*
- 18) Omura T and Takesus S : *A new method for simultaneous purification of cytochrome b<sub>5</sub> and NADPH-cytochrome C reductase from rat liver microsomes. J Biochem*

1970 : 67 : 249-257

- 19) Netter KJ and Seidel G : *An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties.* *J Pharmacol Exp Ther* 1964 : 146 : 61-65
- 20) Isselbacher KJ, Chrabas MF and Quinn RC : *The solubilization and partial purification of glucuronyltransferase from rabbit liver microsomes.* *J Biol Chem* 1962 : 237 : 3033-3036
- 21) Liu SJ, Ramsey RK and Fallon HJ : *Effects of ethanol on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in the rat.* *Biochem Pharmacol* 1975 : 24 : 369-377
- 22) Strittmatter R, Spatz L, Corcora D, Rodgers MJ, Setlow B and Redline R : *Purification and Properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 : 71 : 4565-4569
- 23) McCoy GD, DeMarco GJ and Biaglow JA : *Influence of chronic ethanol consumption on hamster liver microsomal O-dealkylase activities and cytochrome b<sub>5</sub> content.* *Biochem Pharmacol* 1985 : 34 : 4263-4267
- 24) Reinke LA, Kauffman FC and Thurman FG : *Stimulation of p-nitroanisole-O-demethylation by ethanol in perfused livers from fasted rats.* *J Pharmacol Exp Ther* 1979 : 211 : 133-139
- 25) Gadeholt G : *Ethanol and isoniazid induce a hepatic microsomal cytochrome P-450-dependent activity with similar properties towards substrate and inhibitors and different properties from those induced by classical inducers.* *Biochem Pharmacol* 1984 : 33 : 3047-3051
- 26) DiLuzio NR and Kalish GH : *Enhanced peroxidation of lipid in the pathogenesis of acute ethanol-induced liver injury.* *Gastroenterology* 1966 : 50 : 392-393
- 27) Comporti M, Benedetti A and Chieli E : *Studies on in vitro peroxidation of liver lipid in ethanol-treated rats.* *Lipids* 1973 : 8 : 498
- 28) Koster H, Albreach D and Kappus H : *Evidence for carbon tetrachloride and ethanol induced lipid peroxidation in vivo demonstrated by ethane production in mice and rats.* *Toxicol Appl Pharmacol* 1973 : 41 : 639
- 29) Shaw S, JA Ya tilleke E, Ross WA, Gordon ER and Lieber CS : *Ethanol-induced lipid peroxidation : potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine.* *J Lab Clin Med* 1981 : 98 : 417-424
- 30) Dutton GJ : *In Glucuronic acid, Free and Combined.* Dutton GJ ed., New York, Academic Press, 1966 : pp 185-299
- 31) Liliblum W, Walli AK and Bock KW : *Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various agents.* *Biochem Pharmacol* 1982 : 31 : 907-913
- 32) Moldeus P, Andersson B and Norling A : *Interaction of ethanol oxidation with glucuronidation in isolated hepatocytes.* *Biochem Pharmacol* 1978 : 27 : 2583-2588
- 33) Ideo G, de Franchis R, del Ninno E and Dioguardi N : *Ethanol increases liver uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase.* *Experientia* 1971 : 27 : 24-25
- 34) Marniemi J, Aitio A and Vainio H : *Ethanol induced alteration of microsomal membrane bound enzymes of rat liver in vitro.* *Acta Pharmacol et toxicol* 1975 : 37 : 222-232