

## Ethanol 투여 및 한냉 노출이 토끼 부신피질의 11 $\beta$ -Hydroxylase 와 18-Hydroxylase 활성도에 미치는 영향\*

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

이 덕 용 · 성 낙 응

= ABSTRACT =

### Effects of Chronic Ethanol Administration and Cold Exposure on Rabbit Adrenocortical 11 $\beta$ -Hydroxylase and 18-Hydroxylase Activities

Duk-Yong Lee, and Nak-Eung Sung

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

Rabbit adrenocortical mitochondria contains cytochrome P-450 dependent hydroxylase system, capable of catalyzing the hydroxylation as well as other modifications of variety of lipids and foreign compounds, including drugs, pesticides, carcinogens. Ethanol enhances the activity of the microsomal enzyme system, and cold exposure increases various enzyme activity. The present study investigated the effects of chronic ethanol administration and cold exposure on rabbit adrenocortical mitochondrial 11  $\beta$ - and 18-hydroxylase activity, cytochrome P-450 and  $b_5$  and AAF hydroxylation, serum cortisol level and lipid content of the adrenal cortex.

The results obtained are :

- 1) When rabbits were administrated with 15% and 30% ethanol and were exposed to cold, the level of adrenocortical mitochondrial 11  $\beta$ -hydroxylase activity was increased, but 18-hydroxylase activity was slightly increased only in the cold exposure group. This result corresponded with an increase of serum cortisol level.
- 2) When rabbits were administrated with ethanol and were exposed to cold, the level of cytochrome P-450 in adrenocortical mitochondria was increased, but cytochrome  $b_5$  level did not change. Ring-hydroxylation of AAF did not change, but N-hydroxylation was increased.
- 3) When rabbits were administrated with ethanol and were exposed to cold, the levels of total cholesterol and triglyceride in adrenal cortex was remarkably increased, but phospholipid level was reduced.

\* 본 논문은 이화여자대학교 대학원 1982 학년도 박사학위 청구 논문임.

## 서 론

Steroid 화합물의 hydroxylation 반응은 cholesterol 을 squalene 으로부터 합성하는 과정에서 일어나고 또한 cholesterol 대사 과정에서 steroid 호르몬이나 담즙산 생성에 중요한 역할을 한다. 이런 모든 hydroxylation 반응은 mixed function oxidase system 에 의하여 일어나므로 (Stryer, 1981) cytochrome P-450 과 NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 와 분자상태의 산소가 요구되는 반면 CO 에 의해서는 hydroxylation 이 방해된다 (Pyan 과 Engel, 1957). Cytochrome P-450 은 부신의 mitochondria 나 간의 microsome 에서 발견되는 전자전달계의 terminal component 이다. NADPH 는 high potential electron 을 flavoprotein 에 전달하고 다시 nonheme iron protein 인 adrenodoxin 에 전달한다. Adrenodoxin 은 전자를 산화형의 cytochrome P-450 에 전달하며 이로 인해 환원된 cytochrome P-450 이  $O_2$  를 활성화한다 (Stryer, 1981). 이로써 cytochrome P-450 은 간조직내에서 각종 약물들을 hydroxylation 시키거나 부신에서 steroid 화합물의 hydroxylation 과정에 관여한다 (Conney, 1967). 부신피질의 mitochondria 는 cytochrome P-450 hydroxylase system 을 함유하고 있으며 cholesterol 으로부터 side chain 을 제거하여 (이런 cytochrome P-450 을 P-450 scc 라 부른다) pregnenolone 을 만들고 steroid 화합물의  $11\beta$ -와  $18$ -hydroxylation 을 촉매한다 (Magnus 등, 1978). Kominami 등 (1980) 에 의하면 cytochrome P-450 scc 와  $11\beta$ - 및  $18$ -hydroxylation 을 촉매하는 cytochrome P-450 은 면역학적으로 다르다고 보고한 바 있다.

한편 cytochrome  $b_5$  는 NADPH dependent hydroxylation 반응을 조절하는데 중요한 역할을 하며 NADH dependent hydroxylation 과정에 중요한 성분이다 (Lu 등, 1974). 이들 효소군은 연령, 성, 혈통, 종족, 주위 환경, stress, 호르몬, 약물 및 영양상태의 영향을 받는다 (Conney, 1967; Gillette, 1971).

Ethanol 을 섭취하면 간조직에서 이를 대사시키는 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) 의 활성이 증진된다고 하였고 (Lieber 와 DeCarli, 1968; Orme-Johnson, 1965; Teschke 등, 1975; Toban 과 Mezey, 1971) 이와 더불어 phospholipid 와 단백질의 양적 증가와 smooth endoplasmic reticulum 의 증식 (Ishii 등, 1973) 을 초래하며 이들 증식은 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C

reductase 와 같은 효소의 증가도 동반하므로 (Misra 등, 1971; Joly 등, 1973) 알콜 등 약물의 체내대사를 증가시키게 된다. Microsomal ethanol oxidizing system 은 NADPH 와 분자상태의 산소에 의존하며 CO 에 의해 부분적으로 억제된다 (Lieber 와 DeCarli, 1970) 또한 microsomal ethanol oxidizing system 은 여러 약물을 대사시키는 mixed function oxidase system 과 비슷하다고 보고된 바 있다 (Lieber 와 DeCarli, 1970; 1972).

알콜을 대량 투여하면 부신피질 호르몬의 분비를 자극시키고 (Stokes, 1971) 또한 간조직내 지방산 생합성 과정이 증가된다는 보고도 있다 (Horning 등, 1962).

Selye (1946) 는 외상, 마취, 대수술, 화상, 한냉에 노출되는 것들을 "stressors" 라고 명명하였으며 Estep 등 (1966) 과 Asfeldt 등 (1968) 도 이러한 stress 로 인해서 혈청내 cortisol 이 증가됨을 보고하였다. 또한 Vahouny (1963) 와 문 (1966) 등은 계속적인 한냉 노출은 혈청내 총 cholesterol 함량을 증가시키고 간조직내 각 지방성분 함량도 증가시킨다고 하였다.

이와같은 학술적 배경을 바탕으로 저자는 ethanol 투여와 한냉에 노출한 토끼의 부신피질 mitochondria 에서 cytochrome P-450 에 의한  $11\beta$ - 및  $18$ -hydroxylase 의 변화를 관찰하고자 하였으며 또한  $11\beta$ -hydroxylase 에 의하여 생성되는 cortisol 의 혈청내 함량을 측정하여 효소의 활성도와 생성물의 양을 비교하고자 하였다. 이와 더불어 cytochrome P-450 의 변화에 따른 약물대사를 알아보기 위하여 강력한 간암물질인 2-acetylaminofluorene (이하 AAF 로 약기함) 의 ring-hydroxylation 과 N-hydroxylation 을 측정하여 흥미있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### A. 실험재료

#### 1. 실험동물

체중 1.5 kg 내외의 토끼 80 마리를 대조군 및 3 개 실험군으로 나누었다.

#### 2. 실험군

제 1 군 : 대조군으로서 토끼 20 마리를 표준식 (soybean powder : vegetable powder = 50 : 50) 으로 8 주간 사육하였다.

제 2 군 : 매일 1 회에 15% ethanol 용액을 5 ml/kg 씩 stomach tube 를 통해 8 주간 경구 투여하였다.

제 3 군 : 매일 1 회에 30 % ethanol 용액을 5ml / kg씩 stomach tube 를 통해 8 주간 경구 투여하였다.

제 4 군 : 5 °C 의 한냉에 8 주간 매일 2 시간씩 노출시켰다.

### 3. 시 약

가. Bovine serum albumin : Sigma 사 제품

나. [ 1, 2-<sup>3</sup>H ] deoxycorticosterone (0.5 μCi ) : New England Nuclear 사 제품

다. [ 9-<sup>14</sup>C ] AAF (0.2 μCi ) : New England Nuclear 사 제품

라. NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) : Boehringer Mannheim Biochemicals 사 제품

마. Cholesterol : BDH Chemicals 사 제품

### B. 실험방법

#### 1. Mitochondria 의 분리

Mitochondria 의 분리는 Lotlikar 등의 방법 (1967) 에 따라 절제한 부신피질조직은 Potter Elvehjem homogenizer 를 사용하여 0.25M sucrose 용액으로 25 % 균질용액이 되도록 처리하여 냉동원심침전기 (Damon/Model ice B-20A) 로 9,000 ×g 에서 10 분간 원심분리하여 침전물에 0.25 M sucrose 를 가하여 1g/ml 가 되도록 균질용액을 만들었다.

#### 2. 단백질 정량

단백질 함량은 Lowry 등의 방법 (1951) 으로 발색시켜 Spectronic 21 spectrophotometer (Bausch and Lomb) 를 사용하여 700 nm 에서 흡광도를 측정하여 비색정량하였다. 표준용액으로는 bovine serum albumin 을 사용하였다.

#### 3. 11β - hydroxylase 및 18 - hydroxylase 의 활성도 측정

11β - hydroxylase 와 18 - hydroxylase 활성도는 Watanuki 등의 방법 (1977) 으로 측정하였다.

Cysteine (5mM) 과 EDTA (0.5mM) 가 포함된 potassium phosphate buffer (50mM : pH 7.0) 에 차례로 cytochrome P-450 (0.3 ~ 0.4 nmoles), adrenodoxin (10 nmoles), adrenodoxin reductase (16 units) 와 substrate 로 [ 1, 2-<sup>3</sup>H ] deoxycorticosterone (0.5 μCi : 50 nmoles) 을 넣은 다음 NADPH (0.2 nmoles) 를 넣어 30 °C 에서 10 분간 incubation 하였다. Incubation 후 반응을 몇초간 끓는물에 넣어 중지시키고 diethyl ether 로 반응물질을 추출하였다. Trimethylamine (0.1 % v/v) 을 전개제로 사용하여 silicagel thin layer chromatography 로 11β-hydroxylase 와 18 - hydroxylase 를 분리하여 radioimmu-

noassay 에 의하여 각각의 양을 측정하였다.

#### 4. Cytochrome P-450 및 b<sub>5</sub> 의 측정

Mitochondrial cytochrome P-450 함량은 Omura 와 Sato 의 방법 (1964) 에 따라 spectrophotometer (Varian SP-624) 로 490 nm 와 450 nm 에서 reduced-carbon monoxide complex 의 흡광도를 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient 의 차는 91 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> 로 하였다.

Cytochrome b<sub>5</sub> 의 활성은 Smuckler 등의 방법 (1967) 에 따라 cytochrome b<sub>5</sub> 의 환원형과 산화형사이의 흡광도를 424 nm 와 409nm 에서 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient 의 차는 185 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> 로 하였다.

#### 5. Ring-hydroxy AAF 와 N-hydroxy AAF 의 측정

Ring- 과 N-hydroxy AAF 는 Lotlikar 등의 방법 (1967) 에 따라 측정하였다.

AAF 의 ring- 과 N-hydroxylation 을 위한 incubation medium 으로 50mM HEPES buffer (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid : pH 7.8) 0.1ml, 0.1mM [ 9-<sup>14</sup>C ] AAF 0.02ml, 2mM NADPH 0.2ml 및 mitochondrial fraction 0.2 ml 를 넣어 37 °C 에서 30 분간 incubation 하였다.

Incubation 후에 각 시험관에는 4ml 의 ice cold 1M sodium acetate buffer (pH 6.0) 를 가하여 반응을 중지시키고 즉시 diethyl ether 를 가하여 hydroxylation 된 대사를 추출하였다. Ring- 과 N-hydroxy AAF 는 cyclohexane : t-butanol : acetic acid : H<sub>2</sub>O 를 18:2:2:1 의 비로 혼합한 전개제를 사용하여 paper chromatography 로 분리하고 liquid scintillation counter (Packard Tri-CARB 300 CD) 로 radioactivity 를 측정하여 대사물질을 정량하였다.

#### 6. 혈청 cortisol 의 정량

혈청 cortisol 은 Tilden 의 방법 (1977) 으로 Gamma-Coat <sup>125</sup>I-Cortisol Radioimmunoassay Kit, CA-529 (Clinical Assays 사 제품) 를 사용하여 측정하였다.

Micromedic Model 25,000 autodiluter 로 5.0 μl 의 serum 을 취하여 1 ml 의 tris/tracer [ Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (pH 7.4, 10 nmoles/liter) 로 5 ml (0.3 μCi) 의 <sup>125</sup>I-labeled cortisol derivative 용액을 희석해서 55 ml 가 isotonic saline 에 용해되게 했다. ] 를 넣어 antibody (rabbit anti-cortisol serum) - coated tube 에 넣었다. 잘 혼합한 후 45 °C 에서 60 분간 aluminum heating block 에서 incubation 하였다. " Bound " 된 분석물 ( analyte )

과 tube 의 내용물인 "free" analyte 는 free analyte 를 aspiration 하므로써 분리하였다. 각 "Empty" tube 를 Packard Autogamma spectrometer, Model 5112 로 1분간 측정하여 computer calibration 으로 정량하였다.

#### 7. 부신피질내 지질함량 측정

##### 가. 총 cholesterol 함량의 정량

총 cholesterol 의 정량은 Zak 의 방법(1954)을 이용하여 다음과 같이 실험하였다.

1 mg 의 부신피질조직을 1 ml 의 용매 (methanol : acetone = 50 : 50 인 혼합액) 와 homogenize 한 다음 끓는 물에서 기포가 일어날때까지 흔들면서 가열한 후, 실온까지 냉각시켜 용매를 20 ml 까지 채운다. 그것을 Toyo No. 5 B 여지로 여과하였다. 여액 1 ml 를 10 배 또는 20 배 희석하여 희석된 여액 1 ml 를 30 ml 들이 제 1 시험관에 옮겨 끓는 수욕에서 용매를 완전히 증발시키고, 제 2 시험관에는 1 ml 의 working standard 용액 (cholesterol 0.1 mg/ml 빙초산)을 넣고, 제 3 시험관을 준비한다. 이 세개의 시험관에 3 ml 의 빙초산을 가하여 잘 흔들면서 끓는 수욕중에 약 30 초 두었다가 실온까지 냉각시켰다. 그 후 발색시약 (2.5g의 FeCl<sub>3</sub> 를 25 ml 의 빙초산에 용해시켜 저장 용액으로 하고, 이 용액 1 ml 를 진한 황산으로 정확히 100 배 희석하여 working color reagent 로 하였다.) 을 2 ml 씩 각각 가한 다음 잘 혼합하여 20 분간 방치하였다가 Spectronic 21 spectrophotometer 를 사용하여 560 nm 에서 흡광도를 측정하여 calibration curve 에 의해 정량하였다.

##### 나. Phospholipid 함량의 정량

Phospholipid 함량은 Connerthy 등의 방법(1961)을 이용하여 다음과 같이 정량하였다.

16 × 150 mm glass - stoppered tube (10 ml 표시 표시) 에 adrenocortical homogenate 0.2 ml 를 넣고 5 % trichloroacetic acid 5 ml 를 첨가하여 잘 혼합한 후 원심분리하였다. 상층액을 완전히 제거하고 digestion 혼합액 (증류수 : conc - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 70 % perchloric acid = 50 : 25 : 25) 1 ml 와 glass bead 를 넣은 다음 가열소화시켰다.

소화가 끝난 후 1 - 2 분간 냉각시켜 증류수 1 ml 를 넣고 15 초동안 가열하였다. 그 후 50 % sodium acetate 용액을 1 ml 넣고 10 ml 표시까지 증류수로 채웠다. 여기에 2.5 % ammonium molybdate 용액 1 ml 와 Elon 용액 (3 % NaHSO<sub>3</sub> 용액에 P-methylamino phenol sulfate 를 용해시킨 것) 1 ml 를 넣어 잘 혼합한 다음 15 분간 방치하였다가 Spectronic 21 spectrophotometer 로 700 nm 에서 흡광도를 측정하

였다. Reagent blank 는 진한 황산 0.25 ml, 50 % sodium acetate 용액 1 ml, 2.5 % ammonium molybdate 용액 1 ml, Elon 용액 1 ml 와 증류수 8.75 ml 를 잘 혼합하여 준비하였다.

Standard 는 20 μg 의 phosphorus 를 포함한 working standard 용액 (4.394 g 의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 를 증류수로 용해시켜 1ℓ 를 만들어 진한 황산 2 ml 를 넣어 저장 용액으로 하고, 이 용액 1 ml 를 증류수로 250 ml 까지 희석하여 working standard 용액으로 하였다) 5 ml 와 진한 황산 0.25 ml, 50 % sodium acetate 용액을 넣고 unknown 과 똑같은 방법으로 측정하였다.

##### 다. Triglyceride 함량의 정량

Triglyceride 함량은 Handel 과 Zilversmit 의 방법(1957)을 이용하여 다음과 같이 정량하였다.

28 × 130 mm glass - stoppered tube 에 adrenocortical homogenate 1 ml 를 넣고, 18 ml 의 chloroform 을 가하여 마개를 막고 10 분간 세게 흔들었다. Fat-free paper 로 여과한 후 상층액을 1 ml, 2 ml, 3 ml 취하여 3 개의 glass - stoppered tube (15 × 300 mm) 에 넣었다. Standard corn oil 용액 (0.05 mg/ml chloroform) 도 1 ml, 2 ml, 3 ml 취하여 3 개의 유리 시험관에 넣은 후 모든 시험관의 용매를 증발시켰다.

Standard 와 unknown 각각의 제 1, 2 시험관에 0.4 % alcoholic KOH 용액 0.5 ml 를 첨가하였다 (saponified sample). 각각의 제 3 시험관에는 alcohol 0.5 ml 를 가했다 (unsaponified sample). 모든 시험관을 60 - 70 °C 수욕에 15 분간 방치한 다음 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 ml 를 첨가하여 혼합한 뒤 시험관들을 끓는 수욕에 15 분간 넣어 알콜을 제거하였다. 이들을 완전히 냉각시켜 0.05 M sodium metaperiodate 용액 0.1 ml 를 넣고, 10 분 후 0.5 M sodium arsenite 용액 0.1 ml 를 첨가하여 산화반응을 중지시켰다. 요오드색이 사라진 후 0.2 % chromotropic acid 5 ml 를 넣어 혼합한 다음 100 °C 에서 1 시간 30 분간 가열한 후 냉각시켜 Spectronic 21 spectrophotometer 로 570 nm 에서 흡광도를 측정하여 calibration curve 에 의해 함량을 정량하였다.

## 실험 결과

### A. 부신피질 mitochondria 의 11β - hydroxylase 및 18 - hydroxylase 의 활성화도

Ethanol 투여와 한냉노출로 인한 토끼 부신피질 mitochondria 의 11β - hydroxylase 와 18 - hydroxylase 의 활성화도 변화는 Table 1 과 Fig. 1 에서 보는

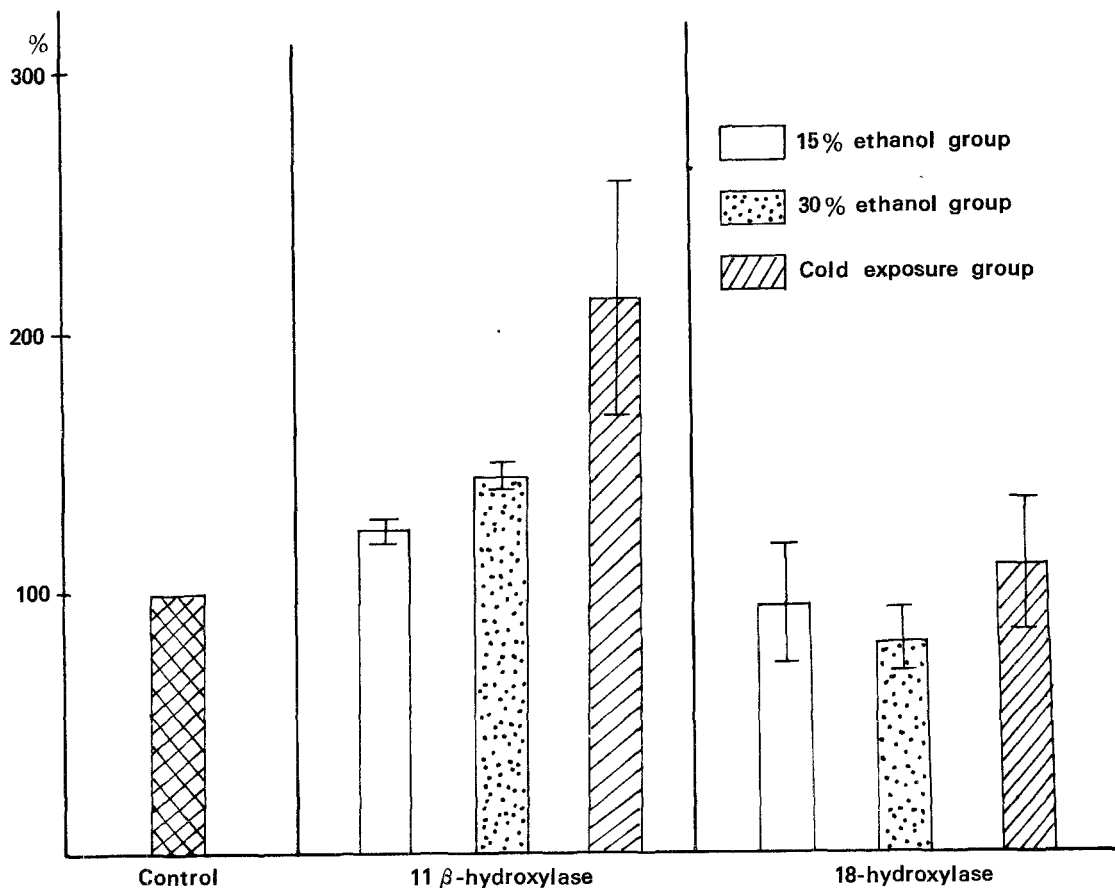


Fig. 1. The level of 11β-hydroxylase and 18-hydroxylase specific activity in rabbit adrenocortical mitochondria treated with ethanol and cold exposure. Each value represents a percentile compared to control data.

Table 1. The level of 11β-hydroxylase and 18-hydroxylase specific activity in rabbit adrenocortical mitochondria treated with ethanol and cold exposure

Group	11β-hydroxylase (nmoles/mg protein)	18-hydroxylase (nmoles/mg protein)
Control	2.67 ± 0.13	0.176 ± 0.037
15% ethanol	3.34 ± 0.09*	0.165 ± 0.041
30% ethanol	3.87 ± 0.11**	0.143 ± 0.025**
Cold exposure	5.67 ± 0.98**	0.195 ± 0.048*

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

\* : significantly different from control value P < 0.05

\*\* : significantly different from control value P < 0.001

바와 같다. 즉 11β-hydroxylase는 15% ethanol과 30% ethanol 투여군에서 각각 3.34 ± 0.09 nmoles/mg protein (이하 nmoles로 약기함), 3.87 ± 0.11 nmoles 이고 한냉 노출군은 5.67 ± 0.98 nmoles로 대조군의 2.67 ± 0.13 nmoles에 비하여 모두 유의 있는 증가를 보였으며 (P < 0.05 ~ P < 0.001), 한편 18-hydroxylase는 15% ethanol 투여군에서는 0.165 ± 0.041 nmoles, 30% ethanol 투여군에서는 0.143 ± 0.025 nmoles로 대조군의 0.176 ± 0.037 nmoles에 비하여 감소된 경향을 나타내었으나 한냉 노출군은 0.195 ± 0.048 nmoles로 유의 있는 증가를 보였다 (P < 0.05).

B. 부신피질 mitochondria내 cytochrome P-450 및 b<sub>5</sub>의 함량

15%와 30% ethanol 투여와 한냉에 노출시킨 토

끼 부실피질 mitochondria의 cytochrome P-450 과 b<sub>5</sub>의 함량은 Table 2와 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

즉 cytochrome P-450 함량은 15% ethanol투여군에서  $8.53 \pm 0.052$  nmoles, 30% ethanol 투여군은  $9.36 \pm 0.067$  nmoles, 한냉 노출군은  $10.45 \pm 0.135$  nmoles 로 대조군의  $7.35 \pm 0.044$  nmoles 에 비하여 전군에 있어 의의있는 증가를 보였다 ( $P < 0.05 \sim P < 0.001$ ).

Cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 15% ethanol 투여군은  $0.157 \pm 0.019$  nmoles, 30% ethanol 투여군은  $0.162 \pm 0.014$  nmoles 로서 대조군의  $0.153 \pm 0.026$  nmoles 에 비하여 ethanol투여군은 큰 차가 없었으나 한냉 노출군에 있어서는 의의있는 증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ).

Table 2. The level of cytochrome P-450 and cytochrome b<sub>5</sub> in rabbit adrenocortical mitochondria treated with ethanol and cold exposure

Group	Cytochrome P-450 (nmoles /mg protein)	Cytochrome b <sub>5</sub> (nmoles /mg protein)
Control	$7.35 \pm 0.044$	$0.153 \pm 0.026$
15% ethanol	$8.53 \pm 0.052^*$	$0.157 \pm 0.019$
30% ethanol	$9.36 \pm 0.067^{**}$	$0.162 \pm 0.021$
Cold exposure	$10.45 \pm 0.135^{**}$	$0.170 \pm 0.014^*$

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 6 experiments.

\* : significantly different from control value  $P < 0.05$

\*\* : significantly different from control value  $P < 0.001$

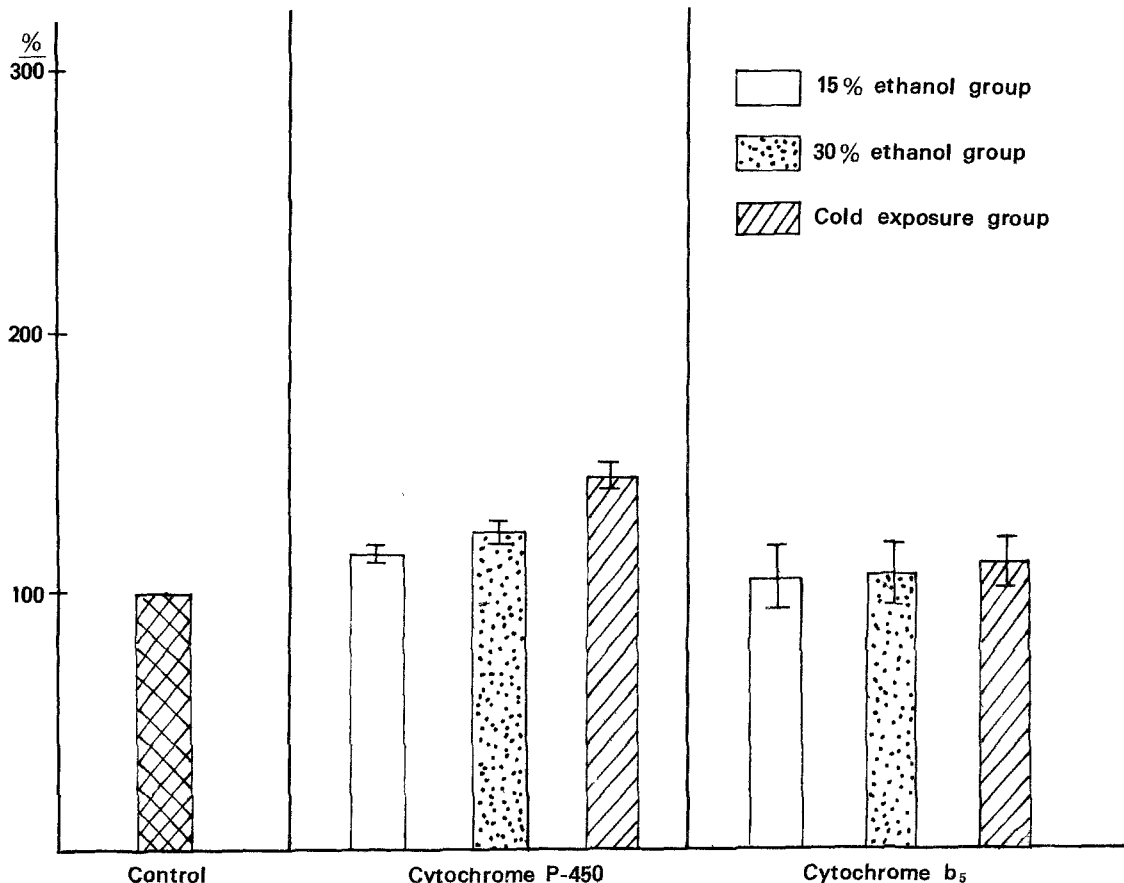


Fig. 2. The level of cytochrome P-450 and cytochrome b<sub>5</sub> in rabbit adrenocortical mitochondria treated with ethanol and cold exposure.

Each value represents a percentile compared to control data.

C. 부신피질 mitochondria의 AAF hydroxylation에 미치는 영향

15% 및 30% ethanol 투여와 한냉에 노출시킨 토끼의 부신피질 mitochondria의 AAF ring-hydroxylation (R-OH AAF) 및 N-hydroxylation (N-OH AAF)의 변화는 Table 3과 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

즉 R-OH AAF는 15% ethanol 투여군에서  $0.52 \pm 0.071$  nmoles, 30% ethanol 투여군에서는  $0.56 \pm 0.043$  nmoles, 한냉 노출군은  $0.55 \pm 0.054$  nmoles로서 대조군의  $0.47 \pm 0.076$  nmoles에 비하여 15% ethanol 투여군을 제외하고는 유의있는 증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ).

한편 N-OH AAF는 15% ethanol 투여군에서  $0.65 \pm 0.033$  nmoles, 30% ethanol 투여군에서는  $0.73$

Table 3. Effects of ethanol and cold exposure on AAF hydroxylation in rabbit adrenocortical mitochondria

Group	R-OH AAF (nmoles / mg protein)	N-OH AAF (nmoles / mg protein)
Control	$0.47 \pm 0.076$	$0.35 \pm 0.017$
15% ethanol	$0.52 \pm 0.071$	$0.65 \pm 0.033^{**}$
30% ethanol	$0.56 \pm 0.043^*$	$0.73 \pm 0.021^{**}$
Cold exposure	$0.55 \pm 0.054^*$	$0.86 \pm 0.019^{**}$

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 6 experiments.

\* : significantly different from control value  $P < 0.05$

\*\* : significantly different from control value  $P < 0.001$

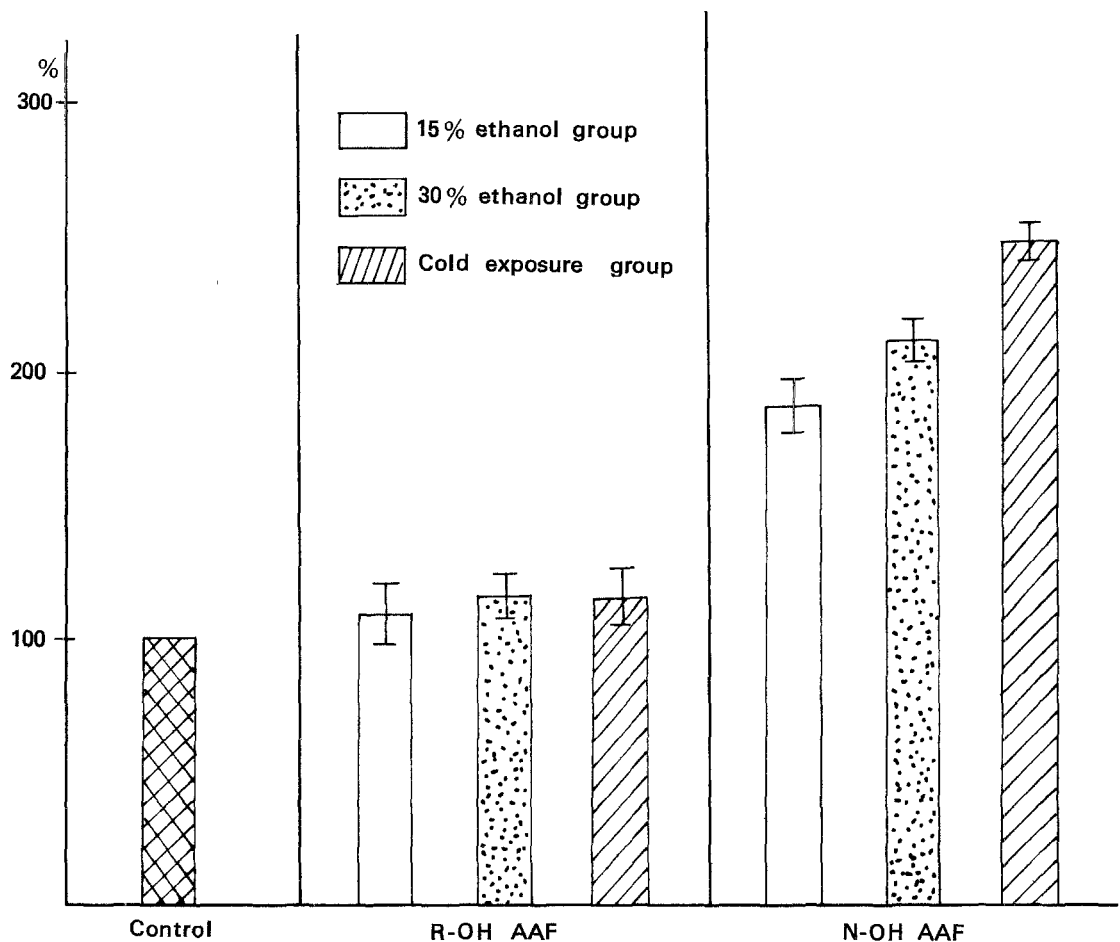


Fig. 3. The level of ring-hydroxy AAF and N-hydroxy AAF in rabbit adrenocortical mitochondria treated with ethanol and cold exposure.

Each value represents a percentile compared to control data.

**Table 4.** Effects of ethanol and cold exposure on serum cortisol of rabbit

Group	Cortisol ( $\mu\text{g} \%$ )
Control	$6.2 \pm 0.21$
15 % ethanol	$30.2 \pm 0.63^{**}$
30 % ethanol	$31.3 \pm 0.76^{**}$
Cold exposure	$72.3 \pm 1.43^{**}$

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 6 experiments.

\*\* : significantly different from control value  $P < 0.001$

$\pm 0.021$  nmoles, 한냉 노출군에서는  $0.86 \pm 0.019$  nmoles 로서 대조군의  $0.35 \pm 0.017$  nmoles 와 비교하여 모두 유의있는 증가를 보였다 ( $P < 0.001$ ).

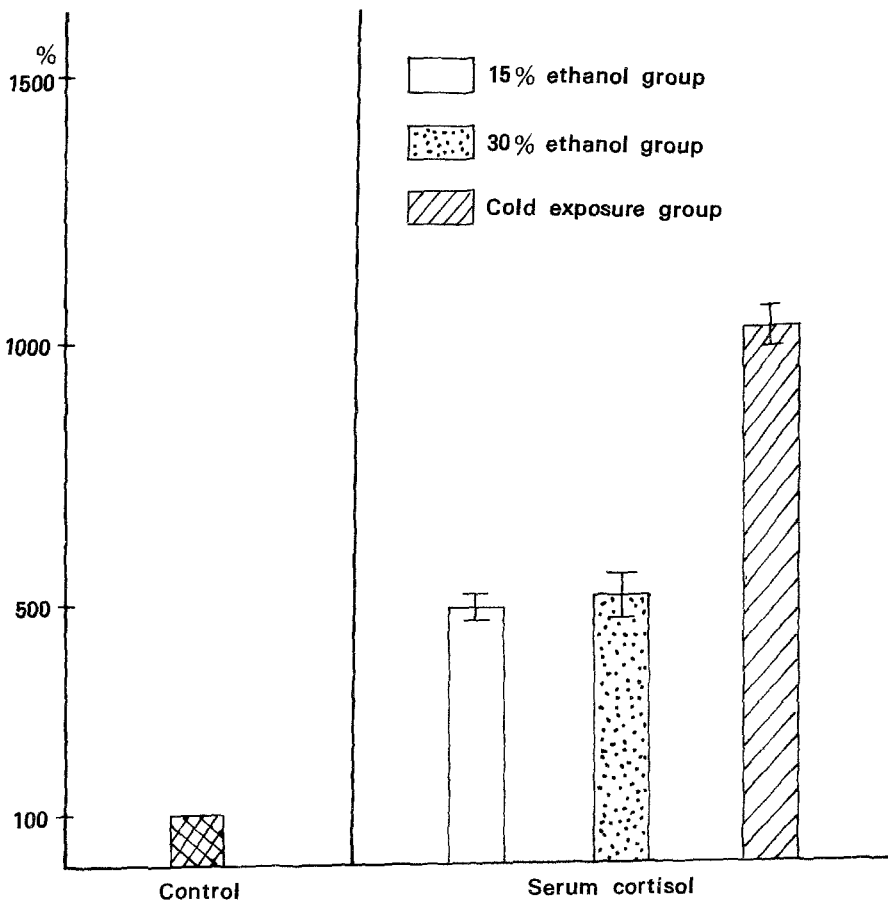
D. 혈청 cortisol 함량

15 % 및 30 % ethanol 투여와 한냉에 노출시킨 토끼 혈청 cortisol 함량의 변화는 Table 4 와 Fig. 4 에서 보는 바와 같다.

즉 15 % ethanol 투여군에서의 혈청 cortisol 함량은  $30.2 \pm 0.63 \mu\text{g} \%$ , 30 % ethanol 투여군은  $31.3 \pm 0.76 \mu\text{g} \%$ , 한냉 노출군은  $72.3 \pm 1.43 \mu\text{g} \%$  로 대조군의  $6.2 \pm 0.21 \mu\text{g} \%$  에 비하여 모두 유의있는 증가를 보였다 ( $P < 0.001$ ).

E. 부신피질내 각종 지질함량

15 % 및 30 % ethanol 투여와 한냉에 노출시킨 후의 토끼 부신피질내 총 cholesterol, phospholipid 및 triglyceride 함량 변화는 Table 5 와 Fig. 5 에서 보는 바와 같다.



**Fig. 4.** The level of serum cortisol of rabbit treated with ethanol and cold exposure. Each value represents a percentile compared to control data.



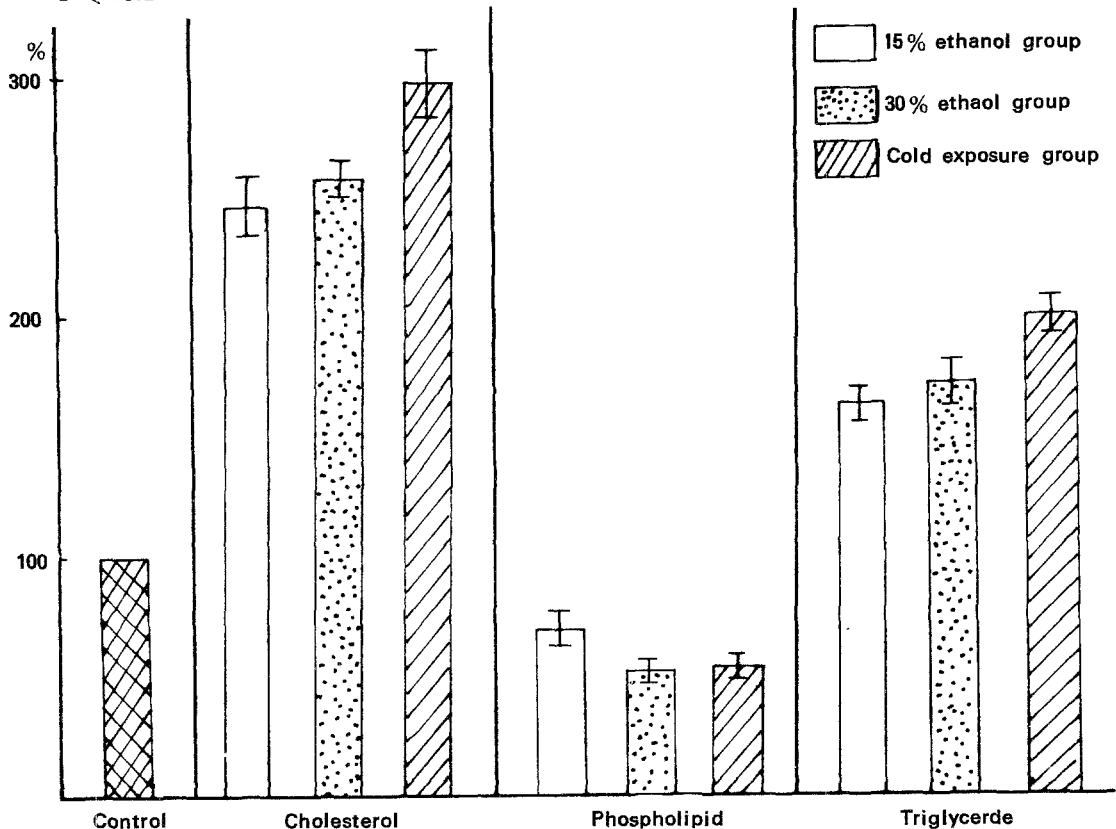
**Table 5.** The contents of total cholesterol, phospholipid and triglyceride in rabbit adrenal cortex treated with ethanol and cold exposure

Group	Total cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ )	Phospholipid ( $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ )	Triglyceride ( $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ )
Control	$3.26 \pm 0.15$	$1.35 \pm 0.05$	$2.15 \pm 0.21$
15 % ethanol	$7.94 \pm 0.34^{**}$	$0.98 \pm 0.07^*$	$3.56 \pm 0.13^*$
30 % ethanol	$8.35 \pm 0.22^{**}$	$0.76 \pm 0.04^{**}$	$3.74 \pm 0.18^{**}$
Cold exposure	$9.77 \pm 0.48^{**}$	$0.77 \pm 0.05^{**}$	$4.17 \pm 0.35^{**}$

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 6 experiments.

\* : significantly different from control value  
P < 0.05

\*\* : significantly different from control value  
P < 0.001



**Fig. 5.** Total cholesterol, phospholipid and triglyceride contents in rabbit adrenal cortex treated with ethanol and cold exposure.

Each value represents a percentil compared to control data.

즉 총 cholesterol 함량은 15 % ethanol 투여군에서  $7.94 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{mg protein}$  (이하  $\mu\text{g}$  으로 약기함), 30 % ethanol 투여군은  $8.35 \pm 0.22 \mu\text{g}$ , 한냉노출군은  $9.77 \pm 0.48 \mu\text{g}$  으로 나타나 대조군의  $3.26 \pm 0.15 \mu\text{g}$  에 비해 모두 유의있는 증가를 보였다 (P < 0.001).

Phospholipid 함량은 15 % ethanol 투여군은  $0.98 \pm 0.07 \mu\text{g}$ , 30 % ethanol 투여군은  $0.76 \pm 0.04 \mu\text{g}$ , 한냉노출군은  $0.77 \pm 0.05 \mu\text{g}$  으로 대조군의  $1.35 \pm 0.05 \mu\text{g}$  에 비해 모두 유의있는 감소를 보였다 (P < 0.05 ~ P < 0.001).

Triglyceride 함량은 15 % ethanol 투여군은  $3.56 \pm 0.13 \mu\text{g}$ , 30 % ethanol 투여군은  $3.74 \pm 0.18 \mu\text{g}$ , 그리고 한냉노출군은  $4.17 \pm 0.35 \mu\text{g}$  으로 대조군의  $2.15 \pm 0.21 \mu\text{g}$  에 비해 모두 유의있는 증가를 보였다 (P < 0.05 ~ P < 0.001).

## 고 찰

### A. 부신피질 mitochondria의 11 $\beta$ - hydroxylase 및 18 - hydroxylase의 활성화 변화

Table 1 및 Fig. 1에서 보는 바와 같이 15%, 30% ethanol투여군과 한냉 노출군의 부신피질 mitochondria 11 $\beta$  - hydroxylase의 활성화도는 대조군에 비하여 증가되었으며 18 - hydroxylase 활성화도는 ethanol투여군에서는 각각 약간 감소되는 경향이었으나 한냉 노출군에서는 증가 되었다.

Jones와 Armstrong (1965), Lieber와 DeCarli (1964) 등의 보고에 의하면 stress는 cholesterol 합성과 steroid 호르몬 생성을 촉진 시킨다고 한점과 Stokes (1971)가 보고한 바와 같이 알콜을 대량 투여하면 부신피질 호르몬의 분비를 자극시킨다는 점을 생각할 때 ethanol투여와 한냉 노출에 의한 hydroxylase의 증가는 cortisol증가와 의의있는 상관관계가 있으며 18 - hydroxylase의 활성화도에 큰 변화가 없는 것은 흥미있는 결과로 사료된다.

### B. 부신피질 mitochondria내 cytochrome P-450 및 b<sub>5</sub> 함량의 변화

Table 2 및 Fig 2에서 보는 바와 같이 15%, 30% ethanol투여군과 한냉 노출군에 있어 토끼 부신피질 mitochondria의 cytochrome P-450의 함량은 대조군에 비하여 증가되었으며 cytochrome b<sub>5</sub> 함량은 큰 변화가 없었다.

알콜을 섭취하면 cytochrome P-450, NADPH - cytochrome C reductase가 증가된다고 보고한 바 있고 (Joly 등, 1973; Misra 등, 1971) Hildebrandt와 Estabrook (1971)는 cytochrome b<sub>5</sub>의 관여하에 전자가 NADH로부터 ferrous cytochrome P-450의 oxygenated complex로 전달된다고 하였으며 본 실험에서도 ethanol에 의하여 cytochrome계 효소활성이 유발된 것으로 나타났다.

### C. 부신피질 mitochondria의 AAF hydroxylation에 미치는 영향

Table 3 및 Fig. 3에서 보는 바와 같이 15%, 30% ethanol투여군과 한냉 노출군의 부신피질 mitochondria의 AAF hydroxylation에 있어서는 AAF ring - hydroxylation은 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으나 N - hydroxylation은 현저히 증가되었다.

이는 알콜 및 steroid의 hydroxylation의 변화율이 cytochrome P-450 함량변화와 관계가 있다는 보고가 있었으며 (Gillette 등, 1972), AAF는 mixed function oxidase system을 통하여 N - hydroxylation ring - hydroxylation으로 대사되므로 cytochrome P-450 함량의 변화는 발암원인 AAF의 hydroxylation 과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Johnson 등, 1980; Kaplan 등, 1978; Matsushima 등, 1972; Peraino 등, 1973; Thorgeirsson 등, 1973).

본 실험결과도 cytochrome P-450 함량이 증가됨과 상응해서 AAF의 N - hydroxylation도 증가됨을 관찰하였다.

### D. 혈청 cortisol 함량 변화에 미치는 영향

Table 4 및 Fig. 4에서 보는 바와 같이 ethanol투여와 한냉 노출에 의한 혈청내 cortisol 함량은 15%와 30% ethanol투여군은 대조군에 비하여 현저히 증가되었으며 한냉 노출군에서도 대조군에 비하여 10 배 이상 증가됨을 보였다.

알콜을 대량 투여하면 corticotropin (ACTH)의 분비를 자극하므로써 부신피질호르몬의 분비를 촉진시킨다고 보고된 바 있다 (Stokes, 1971). 또한 동물을 저온환경에 장기간 노출시키면 혈청내 cortisol이 증가되며 (Panaretto와 Vickery, 1970; Wilson 등, 1970) 사람을 한냉에 노출시켰을 때도 혈장내 cortisol 함량이 증가된다고 하였다 (Jessen, 1980; Wilkerson 등, 1974). 이들은 ethanol투여와 한냉 노출에 의한 stress가 부신피질을 자극하여 corticoid들의 생산을 촉진시킨 결과라고 보겠다.

### E. 부신피질내 각종 지질함량 변화에 미치는 영향

Table 5 및 Fig. 5에서 보는 바와 같이 ethanol투여군과 한냉 노출군에서 부신피질내 총 cholesterol과 triglyceride는 모두 증가되었으며 phospholipid만이 감소되었다.

성 (1962)에 의하면 흰쥐에 알콜을 장기간 투여하므로써 혈청내 총 cholesterol 함량이 증가된다고 하였고 Lieber와 DeCarli (1964)는 cholesterol 생합성도 증가된다고 보고한 바 있다.

사람 (Ginsberg 등, 1974; Grande 등, 1960; Lieber와 DeCarli, 1964), 개 (Grande 등, 1960)와 흰쥐 (Baranona와 Lieber, 1970; Lefevre 등, 1972)에서 ethanol을 전체 칼로리 섭취량의 24% 정도로 주면 간조직이나 혈청 cholesterol 함량이 증가된다고 하였다. 한편 Vahouny 등 (1963)과 문 (1966)에 의하면 계속적

인 한냉노출은 혈청내 총 cholesterol 함량을 증가시키고 간조직내 각 지방성분 함량도 증가시킨다고 하였다.

본 실험에서도 이와같은 보고와 일치하여 모든 군에서 2 배이상의 증가를 보였다.

혈청내 phospholipid 함량은 성(1962)에 의하면 장기적인 알콜투여로 약 50% 내외의 증가를 보였다고 하였고, 조등(1982)의 실험에서는 알콜투여로 인한 혈중 cholesterol, phospholipid 함량이 정상수준이었다고 하였다.

본 실험에서는 약간 감소되는 경향으로서 앞으로 더욱 검토가 요구된다. 또한 혈중 triglyceride 함량은 성(1962)과 문등(1965)의 보고에 의하면 알콜투여로 현저히 증가된다고 하였다. 또 조등(1982)도 알콜을 투여하면 혈중 triglyceride 농도가 증가된다고 보고한 바 있다.

본 실험에서도 각군 모두에서 부신피질내 triglyceride 함량이 60% 이상 증가되는 것을 관찰하였다.

## 결 론

토끼에서 15%, 30% ethanol 투여군과 한냉노출군의 cortisol 생성증가와 더불어 이 호르몬생성에 관여하는 11 $\beta$ -hydroxylase 및 18-hydroxylase 와이에 관계가 있는 cytochrome P-450 및 b<sub>5</sub> 그리고 이들 효소에 의한 hydroxylation 을 보기위하여 AAF 를 모델 화합물로 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Ethanol 투여군과 한냉노출군의 부신피질 mitochondria 의 11 $\beta$ -hydroxylase 는 증가하였으며 18-hydroxylase 는 한냉노출군에서만 약간 증가되었고 ethanol 투여군에서는 특기할만한 변화가 없었다. 이는 혈청내 cortisol 함량의 증가와 일치하였다.

2) Ethanol 투여군과 한냉노출군에서 부신피질 mitochondria 의 cytochrome P-450 은 증가되었으나 b<sub>5</sub> 는 큰 변화가 없었으며 AAF hydroxylation 에 있어서는 ring-hydroxylation 은 큰 변화가 없었으나 N-hydroxylation 은 증가되었다.

3) Ethanol 투여군과 한냉노출군의 부신피질내 총 cholesterol 및 triglyceride 함량은 현저하게 증가되었으나 phospholipid 는 감소되는 경향을 보였다.

## -References-

- 1) 문동진 · 나충은 · 성낙응 : Alcohol 투여로 인한 백서 혈청, 간조직내 지질대사 및 뇌조직내 serotonin 과 monoamine oxidase 활성의 변화에 대한 연구. 현대의학, 3 : 727 - 723, 1965.
- 2) 문동진 : Cold stress cholesterol 대사에 미치는 영향 Cold Stress 를 부하 하였을시 Vitamin A 와 Ginseng 의 효과. 현대의학, 5 : 87 - 96, 1966.
- 3) 성낙응 : 지질대사에 관한 연구 III 알콜 장기투여한 백서의 혈청내 지질량의 변동에 관하여, 서울의대잡지, 3 : 34 - 36, 1962.
- 4) 조만희 · 박천규 · 김창세 : Alcohol 이 백서의 혈액성분에 미치는 영향에 관한 연구. 순천향대학 논문집, 5 : 3 - 9. 1982.
- 5) Asfeldt, V. H. and S. Elb : Hypothalamopituitary adrenal response during major surgical stress, Acta endocr. (Kbh.), 59 : 67, 1968.
- 6) Baranona, E. and C. S. Lieber : Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat, J. Clin. Invest., 49 : 769 - 778, 1970.
- 7) Conney, A. H. : Pharmacological implications of microsomal enzyme induction, Pharmacol. Rev., 19 : 317 - 366.
- 8) Connerthy, H. U., B. R. Briggs, and E. H. Eaton : Simplified determination of the liquid components of blood serum, Clin. Chem., 7 : 37, 1961.
- 9) Estep, H. L., D. L. Litchfields, J. P. Taylor and H. ST. G. Tucker : Acute effect of traumatic stress on cortisol metabolism in man, J. Clin. Endocr., 26 : 513 - 517, 1966.
- 10) Gillette, J. R. : Factors affecting drug metabolism, Ann. N. Y. Acad. Sci., 179 : 43 - 66, 1971.
- 11) Gillette, J. R., D. C. Davis, and H. A. Sasame : Cytochrome P-450 and its role in drug metabolism, Annu. Rev. Pharmacol., 12 : 57 - 84, 1972.
- 12) Ginsberg, H., J. Olefsky. and J. W. Farquhar : Moderate ethanol ingestion and plasma triglyceride levels - A study in normal and hypertriglyceridemic persons, Ann. Intern Med., 80 : 143 - 149, 1974.
- 13) Grande, F., L. J. Hay, and H. W. Heupel : Effect of ethanol on serum cholesterol concentration in dog and man, Circ. Res., 8 : 810 - 819, 1960.
- 14) Handel, E. V. and D. B. Zilversmit : Micromethod

- for the direct determination of serum triglycerides *J. Lab. Clin. Med.*, 50 : 152, 1957,
- 15) Hildebrandt, A. and R. W. Estabrook : Evidence for the participation of cytochrome  $b_5$  in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 143 : 66 - 79, 1971.
  - 16) Horning, M. G., M. J. Earle, and H. M. Malins : Changes in fatty acid composition of liver lipids induced by carbon tetrachloride and ethionine, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 : 175 - 177, 1962.
  - 17) Ishii, H., J. G. Jole, and C. S. Lieber : Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 291 : 411 - 420, 1973.
  - 18) Jessen, K. : The cortisol fluctuations in plasma in relation to human regulatory nonshivering thermogenesis, *Acta anaesth. Scand.*, 24 : 151 - 154, 1980.
  - 19) Johnson, E. F., D. S. Levitt, U. Muller-Eberhard, and S. S. Thorgeisson : Catalysis of divergent pathway of 2-AAF metabolism by multiple forms of cytochrome P - 450, *Cancer Res.*, 40 : 445 - 459, 1980.
  - 20) Joly, J. G., H. Ishii, R. Teschke, Y. Hasumura, and C. S. Lieber : Effect of chronic feeding on the activities and submicrosomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P - 450 reductase and the demethylase for aminopyrine and ethylmorphine, *Biochem. Pharmacol.*, 22 : 1532 - 1535, 1973.
  - 21) Jones, A. L. and D. T. Armstrong : Increased cholesterol biosynthesis following phenobarbital induced hypertrophy of agranular endoplasmic reticulum in liver, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119 : 1136 - 1139, 1965.
  - 22) Kaplan, E., H. R. Gutmann, and T. H. Emory : Microsomal metabolism of arylamides by the rat and guinea pigs, *Biochem. Pharmacol.*, 27 : 1581 - 1589, 1978.
  - 23) Kominami, S., H. Ochi, Y. Kobayashi, and S. Takemori : Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes, *J. Biol. Chem.*, 255 : 3336 - 3394, 1980.
  - 24) Lefevre, A. F., L. M. DeCarli and C. S. Lieber : Effect of ethanol on cholesterol and bile acid metabolism, *J. Lipid. Res.*, 13 : 48 - 55, 1972.
  - 25) Lieber, C. S. and L. M. DeCarli : Effect of ethanol on cholesterol metabolism, *Clin. Res.*, 12 : 274, 1964.
  - 26) Lieber, C. S. and L. M. DeCarli : Ethanol oxidation by hepatic microsomes - Adaptive increase after feeding, *Science*, 162 : 917 - 918, 1968.
  - 27) Lieber, C. S. and L. M. DeCarli : Hepatic microsomal ethanol oxidizing system - In vitro characteristics and adaptive properties in vivo, *J. Biol. Chem.*, 245 : 2505 - 2512, 1970.
  - 28) Lieber, C. S. and L. M. DeCarli : The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 181 : 279 - 287, 1972.
  - 29) Lotlikar, P. D., M. Enomoto, J. A. Miller, and E. C. Miller : Species variation in the N- and ring hydroxylation of 2-acetylaminofluorene and effects of 3-methylcholanthrene pretreatment, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125 : 341 - 346, 1967.
  - 30) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. T. Randall : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265 - 275, 1951.
  - 31) Lu, A. Y. H., S. B. West, M. Vore, D. Ryan, and W. Levin : Role of cytochrome  $b_5$  in hydroxylation by a reconstituted cytochrome P - 450 containing system, *J. Biol. Chem.*, 249 : 6701 - 6709, 1974.
  - 32) Magnus, I. S., M. Johan, R. Ran, and J. A. Gustafsson : The active form of cytochrome P - 450  $11\beta$  from adrenal cortex mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 253 : 5042 - 5047, 1978.
  - 33) Matsushima, T., P. H. Grantham, E. K. Wesburger, and J. H. Weisburger : Phenobarbital-mediated increase in ring and N-hydroxylation of the carcinogen N-fluorenglacetamide and decrease in amounts bound to liver deoxyribonucleic acid, *Biochem. Pharmacol.*, 21 : 2043 - 2051, 1972.

- 34) Misra, P. S., A. Lefevre, H. Ishii, E. Rubin, and C. S. Lieber : Increase of ethanol, mepr-obarmate and phenobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and rats, *Amer. J. Med.*, 51 : 346, 1971.
- 35) Omura, T. and R. Sato : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes—II solubilization, purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 239 : 2370—2378, 1964.
- 36) Orme-Johnson, W. H. and D. M. Ziegler : Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21 : 78—82, 1965.
- 37) Panaretto, B. A. and M. R. Vickery : The rates of plasma cortisol entry and clearance in sheep before and during their exposure to a cold, wet environment, *J. Endocr.*, 47 : 273, 1970.
- 38) Peraino, C., R. J. M. Fry, E. Staffeldt, and W. E. Kisielles : Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-AAF-induced hepatic tumorigenesis in the rat, *Cancer Res.*, 33 : 2701—2705, 1973.
- 39) Ryan, K. J. and L. C. Engel : Hydroxylation of steroids at carbon 21, *J. Biol. Chem.* 225 : 103—114, 1957.
- 40) Selye, H.: The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation, *J. Clin. Endocr.*, 6 : 117, 1946.
- 41) Smuckler, E. A., E. Arrhenius, and T. Hulton : Alterations in microsomal electron transport, oxidative N-methylated and azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine induced liver injury, *Biochem. J.*, 103 : 55—64, 1967.
- 42) Stokes, P. E. : Alcohol—endocrine relationships. In, *The Biology of Alcoholism*, Vol. 1. Biochemistry (Kissin, B., and Begleiter, H., eds.) Plenum Press, New York, pp. 397—436, 1971.
- 43) Stryer, L. : *Biochemistry*, 2nd ed., San Francisco : W. H. Freeman and company., p. 475, 1981.
- 44) Teschke, R., Y. Hasumura, and C. S. Lieber : Hepatic microsomal alcohol-oxidizing system. Affinity for methanol, ethanol, propanol, and butanol, *J. Biol. Chem.*, 250 : 7397—7404, 1975.
- 45) Thorgeirsson, S. S., D. J. Jellow, H. A. Sasame, I. Green, and J. R. Mitchell : The role of cytochrome P-450 in N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene, *Mol. Pharmacol.*, 9 : 398—404, 1973.
- 46) Tilden, R. L. : New, Advantageous approach to the direct radioimmunoassay of cortisol, *Clin. Chem.*, 23 : 211—215, 1977.
- 47) Tobon, F. and E. Mezey : Effect of ethanol and drug metabolizing enzymes and on rates of ethanol degradation, *J. Lab. Clin. Med.*, 77 : 110—121, 1971.
- 48) Vahouny, G. V., A. Moede, B. Silver, and C. R. Treadwell : Nutrition studies in the cold. Iv. Effect of cold environment on experimental atherosclerosis in the rabbit, *J. Nutr.*, 79 : 45—52, 1963.
- 49) Watanuki, M., B. E. Tilley, and P. E. Hall : Purification and properties of cytochrome P-450 (11 $\beta$ - and 18-hydroxylase) from bovine adrenocortical mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 483 : 236—247, 1977.
- 50) Wilkerson, J. E., P. N. Raven, N. W. Bolduan, and S. M. Horvuth : Adaptions in man's adrenal function in response to acute cold stress, *J. Appl. Physiol.*, 36 : 183—189, 1974.
- 51) Wilson, O., P. Hedner, S. Laurell, B. Nosslin, C. Rerup, and E. Rosengren : Thyroid and adrenal response to acute exposure in man, *J. Appl. Physiol.*, 28 : 543, 1970.
- 52) Zak, B. : Rapid estimation of free and total cholesterol, *Am. J. Clin. Pathol.*, 24 : 1307—1313, 1954.