

## Alcohol 투여가 흰쥐 성장과정에 따른 MFO의 활성 변화에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실

김 경 희

= Abstract =

### Postnatal Development of Activities of MFO in Hepatic Microsomes from Rats Treated with Alcohol

Kyung Hee Kim

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

General concepts of hepatic drug-metabolizing enzymes in liver microsomes and the characteristics of induction of the enzyme are well known in adult rats. However there are few detailed reports on the properties of the enzymes and characteristics of the induction in the rat fetus. The present investigation examined the effect of maternal consumption of alcohol during pregnancy and lactation on the activities of mixed function oxygenase of liver microsomes of the neonatal rats.

The levels of the electron transfer system, such as cytochrome P-450, NADPH cytochrome C reductase were increased from 2nd week to 3rd week of postnatal age and then decrease on the alcohol treated group.

The activities of 7-ethoxycoumarin-o-deethylase were increased until 3rd week of postnatal age and then decreased on the alcohol treated group compared to control group.

These results suggested that induction of MFO were stimulated by alcohol were disturbed the liver microsomal drug metabolism.

### 서 론

간 조직의 microsome내에는 mixed function oxidase 또는 monooxygenase라고 불리는 산화 효소군이 존재하며 세포막과 결합되어 있다. 이 효소는 내인적 물질인 스테로이드, 지방산 및 담즙산등과 외인적 물질인 약물, 발암물질, 살충제 및 많은 다른 이물질 (xenobiotics) 대사에 관여하는 전자 전달체로서 작용한다<sup>1)2)3)4)5)</sup>. 이 효소

계는 기질의 성질에 따라 hydroxylation, oxidative dealkylation 및 N-oxidation과 같은 산화 반응을 일으킨다<sup>5)6)</sup>. 어떤 약물과 화합물들은 microsome내의 monooxygenase system의 주요 성분인 cytochrom P-450의 양을 증가시키고 그 oxidase 활성을 촉진 시킴으로 기질의 대사를 증가 시키기도 하고<sup>7)8)</sup> 반면 어떤 약물들은 cytochrome P-450의 기능을 억제하여 간조직내의 약물의 biotransformation을 억제하기도 한다. 이 효소계는 종족,

연령, 성별, 영양상태, 체내 호르몬변화 및 각종 약물에 의하여 많은 변화를 보인다<sup>9)10)</sup>. Lowry 등<sup>11)</sup> 은 연령에 따른 간조직 약물대사효소의 활성 변화를, Kamataki 등<sup>10)</sup> 은 성별에 따른 경향을 보고한 바 있다.

기호품으로 널리 애용되는 알코올은 인체의 생화학 반응계에 영향을 미치는 바 임신부의 음주는 알코올이 태반을 통과하여 태아의 발달 및 발육 과정에 지대한 영향을 미침이 보고된바 있다<sup>12)13)14)</sup>.

본 연구는 임신 및 수유기에 알코올을 먹은 어미에서 태어난 신생회귀의 간조직의 microsome에서 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase와 7-ethoxycoumarin-O-deethylase를 측정하여 각 성장단계에서 monooxygenase에 관여하는 효소의 활성도를 측정하여 비교 검토하여 보았다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 어미 흰쥐

정상조건으로 사육한 체중 250g 내외의 성숙흰쥐 (Sprague-Dawley) 를 임신시켰다.

임신한 경험이 없는 암흰쥐를 표준질 도막법에 의하여 발정기로 판정되던 숫흰쥐와 동거시키고 다음날 오전에 질전(vaginal plug) 이 확인되면 이날을 임신 제1일로 산정하였다. 흰쥐들은 정상흰쥐와 알코올을 먹인 흰쥐로 구분하여 사육하였다.

(1) 성장흰쥐 : 전체 임신기(평균 21일) 및 수유기(출산후 3주간)에 규정 사료 및 물을 자유롭게 공급하였다.

(2) 알코올을 먹인 흰쥐 : 임신 및 수유기에 규정사료를 자유롭게 공급하였으며 임신 제 1일부터 출산까지 그리고 수유기에서도 12%의 알코올을 주었다(ad libitum).

#### 2) 신생 흰쥐

신생흰쥐는 어미흰쥐의 실험조건에 따라 대조군과 실험군으로 구별하여 비슷한 체중의 흰쥐를 각각 10마리씩 사용 하였다(총 180마리).

(1) 대조군 : 정상흰쥐에서 출생하고 수유기에도 정상흰쥐의 젖으로 성장시켜서 출생 1, 7, 14,

21, 35일 및 49일된 간조직을 사용하였다

(2) 실험군 : 알코올을 먹인 흰쥐에서 출생하고 수유기에도 알코올을 먹인 어미 흰쥐 젖을 먹여 성장시켜 49일까지 계속 알코올을 주었다. 출생 1, 7, 14, 21, 35일 및 49일된 간조직을 사용하였다. 모든 실험동물은 24시간 금식시킨후 희생시켜서 간조직을 절제하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) Microsome의 분리

Microsome의 분리는 흰쥐에서 절제한 간조직을 homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose용액으로 25% homogenate를 만들었다. 이를 9.000g에서 20분간 원심분리 하고 다시 그 상층액을 9.000g에서 10분간 원심분리하여 침전되는 핵과 mitochondria층을 제거 하였다. 이 상층액을 다시 105000g에서 1시간 동안 초원심분리기(Beckman-Model 8.80)으로 원심분리하여 침전된 microsome을 분리하였고 0.25M sucrose로 1g/ml되게 균질용액을 만들었다.

#### 2) 단백질 정량방법

단백질의 함량측정은 Lowry 등<sup>11)</sup>의 방법으로 발색하여 700 nm에서 spectrophotometer (spectronic 2000 Bauch and Lomb)를 측정하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

#### 3) Cytochrome P-450의 정량법

Cytochrome P-450의 함량측정은 Omura 와 Sato의 방법으로 reduced carbon monoxide complex를 450nm와 490nm에서 spectrophotometer (perkin-Elmer 554)로 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient는  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

#### 4) NADPH-cytochrome C reductase의 활성 측정방법

NADPH-cytochrome C reductase의 활성은 Omura와 Takesue 등<sup>16)</sup>의 방법을 사용하여 550 nm에서의 흡광도 증가를 측정 하여 계산 하였으며 이때의 molar extinction coefficient 는  $21.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

#### 5) 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase의 측정방법

**Table 1.** Postnatal development of cytochrome P-450 content in hepatic microsomes of neonatal rats

Age(days)	Cytochrome P-450 (nmole/mg protein)		
	Control	Alcohol treated group	p-value
Postnatal 1	0.341 ± 0.026	0.348 ± 0.035	
7	0.528 ± 0.038	0.491 ± 1.044	< 0.05
14	0.397 ± 0.073	0.635 ± 0.038	< 0.01
21	0.660 ± 0.006	0.831 ± 0.082	< 0.01
35	0.621 ± 0.0082	0.570 ± 0.050	< 0.05
49	0.645 ± 0.045	0.531 ± 0.042	< 0.01

7-ethoxycoumarin-O-deethylase의 활성은 Greenlee와 Poland의<sup>17)</sup> 방법으로 반응 혼합물을 65μ potassium phosphate buffer(PH 7.2), 0.5 μmol NADPH, 0.5μmol NADH, 5.0μmol MgCl<sub>2</sub>, 1mg bovine serum albumin microsomes(1mg protein) 그리고 0.5 μmol의 7-ethoxycoumarin과 10분간 37 °C에서 incubation한후 emission 456nm와 excitation 368nm에서 7-hydroxycoumarin의 농도를 측정하였다.

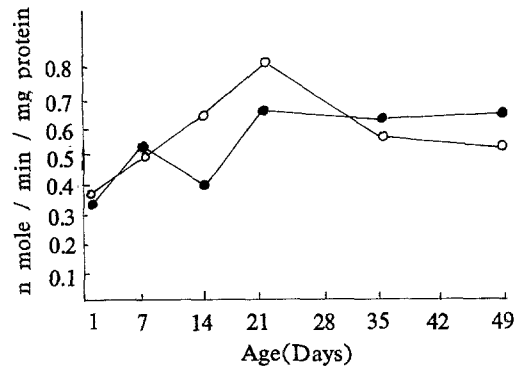
### 실험결과

흰쥐의 성장에 따른 간조직 microsomes에서의 monooxygenase system의 활성도를 보기 위하여 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase 및 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase를 나이별로 측정하였고 동시에 알코올 투여에 의한 결과도 측정하여 Fig. 1, 2, 3 및 Table 1, 2, 3에 나타내었다.

Cytochrome P-450의 활성은 대조군에서 생후 첫날 0.341+0.026에서 빠르게 증가하여 0.528+0.038로 증가하여 생후 21일에는 0.660±0.006으로 성숙수준에 도달하였고 이 이후는 생후 49일까지 별변화가 없었다. 알코올 투여군은 생후 빠른 증

가를 보여 생후 21일에 성숙 수준의 125%에 달하는 0.831±0.082로 최고치를 나타내어 대조군보다 현저한 상승을 보였으나 이 이후 감소하여 대조군보다 낮은 농도를 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

NADPH-Cytochrome C reductase의 활성도는 대조군에서 출생 후 점차 증가하여 생후 21일에 55.10±1.86 으로 최고치를 나타내었고 이 이후 감소하여 성숙 수준으로 되었다. 알코올 투여군도 생후 빠른 증가를 나타내어 생후 21일에 최고치를



**Fig. 1.** Postnatal development of cytochrome P - 450 Content in hepatic rat microsomes. (●-●, control; ○-○, alcohol treated)

**Table 2.** Postnatal development of NADPH-cytochrome C reductase activity in hepatic microsomes of rats

Age(days)	NADPH-cytochrome C reductase(nmole/min/mg protein)		
	Control	Alcohol treated group	p-value
Postnatal 1	12.01 ± 1.08	11.50 ± 1.53	< 0.001
7	32.75 ± 1.70	13.60 ± 0.91	< 0.001
14	21.99 ± 1.71	28.45 ± 1.02	< 0.001
21	51.10 ± 1.86	57.13 ± 2.67	< 0.001
35	45.22 ± 2.62	40.24 ± 2.04	< 0.05
49	49.15 ± 3.01	44.51 ± 3.61	< 0.05

나타내었고 이는 대조군에 비하여 유의성 있는 상승을 나타내었으나 이 이후는 감소하여 대조군보다 낮은 수준을 나타내었다(Tabel 2, Fig. 2).

7-Ethoxycoumarin-O-deethylase의 활성은 대조군에서 생후 21일에  $1.78 \pm 0.09$ 로 성숙수준이 되었으며 이 이후에는 별 변화가 관찰되지 않았다. 알코올 두 여군에서는 생후 21일에  $2.77 \pm 0.09$ 로 최고치를 나타 내었고 이는 대조군의 최고치에 비하여 현저히 높았다. 이 이후는 감소하기 시작하여 생후 49일에는 대조군보다 낮은 활성도를 나타내었다(Table 3, Fig. 3).

## 고 안

포유동물의 간조직의 microsome 내에는 2 종류의 전자전달계가 존재한다. 하나는 Cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase 및 phosphatidylcholine으로 구성되어 있으며 다른 하나는

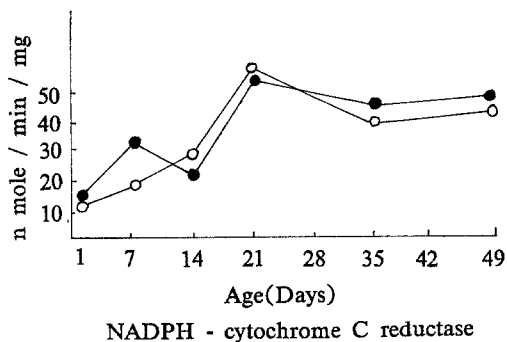


Fig. 2. Postnatal development of NADPH - cytochrome C reductase activity in hepatic rat microsomes.(●-●, control; ○-○, alcohol treated)

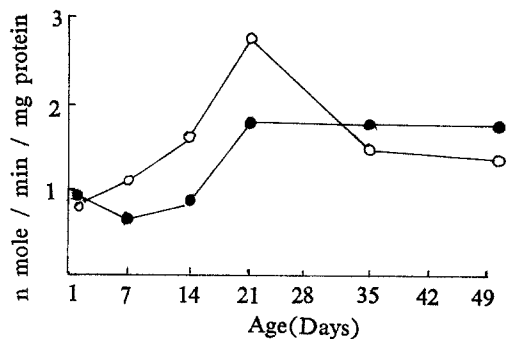


Fig. 3. Postnatal development of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity in hepatic rat microsomes.(●-●, control; ○-○, alcohol treated)

cytochrome b<sub>5</sub>, NADH-cytochrome C reductase 및 cyanide-sensitive factor로 구성되어 있다. 그러나 대부분의 Monooxygenase반응들을 cytochrome P-450 과 NADPH-Cytochrome C reductase를 포함하고 있는 system에서 일어난다.

어떤 약물이나 화학물질들은 cytochrome P-450의 함량이나 그 외의 다른 monooxygenase system의 효소활성을 증가 시키며 또한 약물대사 능력이 증가 할때는 약물대사 효소계의 중요성분인 cytochrome P-450의 농도도 증가함이 입증되었다<sup>18)</sup>.

알코올 장기 투여시 hepatic smooth endoplasmic reticulum과 cytochrome P-450 및 이에 관련된 효소의 활성도가 증가함은 이미 보고된 바가 있다(19)20)21).

Liu등<sup>21)</sup>은 알코올을 장기 투여 할때 성별, 섭취량 또는 섭취기관에 따라 약물효과에 미치는 영향이 복합적임을 보고하였고 McCoy등<sup>22)</sup>은 hamster에 알코올을 투여하였을때 microsomes의 stearyl CoA desaturase의 활성의 감소가 cytoch-

Table 3. Postnatal development of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity in hepatic microsomes of rats.

Age(days)	7-ethoxycoumarin-O-deethylase(nmole/min/mg protein)		
	Control	Alcohol treated group	p-value
Postnatal 1	$0.93 \pm 0.09$	$0.82 \pm 0.04$	
7	$0.66 \pm 0.05$	$1.07 \pm 0.08$	< 0.01
14	$0.87 \pm 0.08$	$1.55 \pm 0.08$	< 0.001
21	$1.78 \pm 0.07$	$2.77 \pm 0.09$	< 0.001
35	$1.75 \pm 0.07$	$1.46 \pm 0.04$	< 0.05
49	$1.80 \pm 0.08$	$1.32 \pm 0.06$	< 0.05

rome b<sub>5</sub>의 함량 감소를 수반 하나 NADPH-cytochrome C reductase 의 감소는 없었음을 보고하였다. 또한 Jolly등<sup>23)</sup>은 알코홀을 먹인후 smooth microsome에서 microsomoal ethanoal oxydizing system (MEOS)과 Cytochrome P-450 이 증가 하였음을 보고하였고 Fallen등<sup>24)</sup>도 알코홀을 먹인 흰쥐의 microsome의 smooth fraction에서 NADPH-cytochrome C reductase 의 활성과 aminopyrine 과 ethylmorphine demethylation 이 증가한 결과를 관찰하였다.

본 연구에서도 이들의<sup>23)24)25)</sup> 결과와 유사하게 임신과 수유기에 알코홀을 투여한 흰 쥐가 대조군에 비하여 생후 2주와 3주 사이에 cytochrome P-450과 NADPH-cytochrome C reductase의 활성도가 증가 하여 알코홀이 microsomal electron transfer system의 활성을 증가 시켰음을 알 수 있었다.

McCoy등<sup>22)</sup>은 장기간 알코홀을 투여한 hamster 간장에서 분리한 microsome 에서 ethoxyresorfin-O-deethylase의 활성이 감소 하며 이는 cytochrome b<sub>5</sub>의 활성과 밀접한 관계가 있음을 기술 하였는데 본 연구에서는 임신과 수유기에 알코홀을 투여한 실험군에서 생후 3주까지 대조군보다 현저히 높았으나 이 이후 부터는 감소 하는 경향을 나타내었는데 이것은 알코홀 장기 투여로 인한 것으로서 McCoy<sup>22)</sup>등의 보고를 뒷받침 할 수 있는 결과로 생각할 수 있다.

결론적으로 실험군과 대조군에서 나이에 따른 mixed function oxidase 의 활성은 두 군 모두에서 출생 21일에 가장 많이 증가하였으나 그 이후에는 대조군이 현저히 높음으로 태아기와 신생아기에 알코홀에 노출될 경우 microsomal electron transfer system의 활성이 초기에는 증가되지만 3주 이상의 장기 투여시에는 오히려 활성이 저하됨을 관찰할 수 있었다.

## 결 론

태생기와 수유기에 알코홀을 투여한 신생 흰쥐와 정상 흰쥐의 간 조직내의 microsome에서 cytochrome P-450, NADPH cytochrom C reductase 및 7-Ethoxycoumarin-O-ethylase의 함량 및 성분을

나이별로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Cytochrome P-450의 함량은 대조군에 비하여 출생 직후는 비슷하였으나, 생후 2주에서 3주 사이에 현저히 높았고 3주 이후에는 오히려 감소를 나타내었다.

2) NADPH Cyrochrome C reductase의 함량은 대조군에 비하여 생후 1주까지 낮았으나 2주와 3주 사이에는 현저한 상승을 나타내었고 이 이후는 낮은치를 나타내었다.

3) 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase의 활성은 대조군에 비하여 생후 3주까지 현저히 높았으나 이 이후는 감소하는 경향을 나타내었다.

## References

- 1) Gelboin HV : *Pyrene metabolism, activation and carcinogenesis : Role and regulation of mixed-function oxidase and related enzymes. Physiol Rev* 1980 : 60 : 1107-1166
- 2) Lu AHY and West SB : *Multiplicity of mammalian microsomal cytochrome P-450. Pharmacol* 1979 : 31 (4) : 277-295
- 3) Sato R and Kato R : *Microsomes, drugoxidation and drug toxicity. Japan scientific societies press, Tokyo* 1982
- 4) Coon MJ, Conney AH, Estabrook RE, Gelboin HV, Gilletes JR, and O'Brien PJ : *Microsome drug oxidation and Chemical carcinogenesis. Academic press, New York* 1980
- 5) Orrenius S and Ernster L : *Molecular mechanisms of oxygen activation. Osmu Hayaishi, Kyoto Japan* 1974
- 6) Buege JA, Aust SD : *Microsomal lipid peroxidation. Method Enzymol* 1978 : 52 : 302-310
- 7) Miller ON : *Liver microsomal drug metabolizing system, function components and their properties. Fed Proc* 1976 : 35(13) : 2460-2463
- 8) Tonda K, Hasegawa T and Hirada M : *Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatments on monoxygenase activities and proportion of isolated rat hepatocyte subpopulations. Mol Pharmacol* 1983 : 23(1) : 235-243
- 9) Chiang JY, Dilella AA, Steggle AW : *Effect of inducers and aging on rabbit liver microsomal drug-metabolizing enzymes. Mol Pharmacol* 1983 : 23(1)

: 244-251

- 10) Kamataki T, Moeda K, Shiraada M, Kitani K, Negai T and Kato R : *Age-related alteration in the activities of drug metabolizing enzymes and contents of sex specific forms of cytochrome P-450 and in liver microsomes from male and female rats. J Pharmacol Exp Therp* 1985 : 233(1) : 222-228
- 11) Lowry OH, Rosenbergh NJ, Farr AL and Randall RJ : *Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 : 193 : 265
- 12) Avery ME and Taensch HW Fr : *Disease of the newborn 5th Ed., WB Saunders Philadelphia P13* 1984
- 13) Cloherty JP and Stark AR : *Manual of neonatal care 2nd Ed., Little brown company, Boston/Toronto P590-591* 1985
- 14) 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
- 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) Takesus S and Omura T : *A new method for simultaneous purification of cytochrome b5 and NADPH-cytochrome C reductase from fat liver microsomes. J Biochem* 1970 : 67 : 249-257
- 17) Greenlee WF and Poland A : *An improved, assay of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity : Induction of hepatic enzyme activity in 57 BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. J Pharmac Expt Ther* 1978 : 205 : 596-605
- 18) Lu AHY, Kunzman R, West S, Jacobson M, and Conney AH : *Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrates. J Biol Chem* 1972 : 247 : 1727
- 19) Ishii H, Jolly JG and Lieber CS : *Effects of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes. Biochem Biophys Acta* 1973 : 291 : 411-420
- 20) Rubbin E, Hutterer F and Lieber CS : *Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. Science* 1968 : 159 : 1469-1470
- 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) McCoy GD, DeMarcs GH and Biaglow JA : *Influence of chronic ethanol consumption on hamster liver microsomal O-dealkase activities and cytochrome b5content. Biochemi Pharmacol* 1985 : 34 : 4263-4267
- 23) Jolly JG, Ishith, Teschke R, Hasumura Y and Lieber CS : *Effects of chronic ethanol feeding on the activities and submicrosomal distribution of reuduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P-450 reductase and the demethylase for minopyrine and ethylmorphine. Biochem Pharmacol* 1973 : 22 : 1532-1535
- 24) Falleu Hoy and Ramsy RK : *Reduction of microsomal N-demethylase activity by prolonged ethanol ingestion in the rat. Gastroenterology* 1972 : 62 : 174