

알코올 투여가 흰쥐 간조직의 지질함량과 2-Acetylaminofluorene Hydroxylation에 미치는 영향*

이화여자대학교 의과대학 의과학교실

(지도: 성낙응 교수)

최금자

=ABSTRACT =

Effects of Chronic Alcohol Feeding on the Lipid Contents in the
Rat Liver and the Hepatic Microsomal

2-Acetylaminofluorene (2-AAF) Hydroxylation in Vitro

Choi, Kum Ja

Dept. of General Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University

It is now well established that ethanol exerts different effects on hepatic cellular metabolism, depending mainly on the duration of its intake. And induction of quantitative and qualitative alterations in the cytochrome P-450 of hepatic microsomes after chronic ethanol feeding is a well-documented phenomenon.

But the effect of ethanol ingestion on the drug metabolism appear paradoxical and the ability of chronic ethanol ingestion to potentiate the carcinogenicity of 2-acetylaminofluorene (2-AAF) by microsomal activation is not confirmed yet.

The present study was undertaken to demonstrate the effects of 15%, 30% ethanol and a commercial liquor feeding for 16 weeks on the lipids in the rat liver, hepatic microsomal cytochrome P-450 and b5, and to elucidate whether or not ethanol-induced rat microsomes can increase the risk of cancer by increasing the rate of metabolic activation of 2-AAF in vitro.

The results are followings.

1) The chronic alcohol feeding increased the contents of total cholesterol and triglyceride in the liver, but did not make a significant influence on the phospholipid contents of liver.

2) The 8 week alcohol feeding increased the hepatic microsomal cytochrome P-

* 이 연구는 1982년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 이루어진 것임.

450 without the change of cytochrome b5, but the 16' week feeding decreased P-450 significantly.

3) The chronic alcohol feeding elevated the AAF N-hydroxylation continuously but did not influence on AAF ring-hydroxylation.

4) The correlation of AAF N-hydroxylation and the increases of hepatic lipid contents was indicated.

서 론

알코올 섭취와 간경화증의 linear-relationship 및 간경화증과 간암간의 밀접한 관계는 주지의 사실이다¹⁾ (2,3,4). 그러나 간경화증 그 자체가 전암성 (prealignant) 상태인지 혹은 알코올이 공통원인 인자로서 두 질환을 공히 유발시킬 수 있는지는 아직도 중요 연구 대상이 되고 있다.

간은 알코올 중독에 가장 영향을 많이 받는 조직이며, 장기간의 알코올 섭취에 의한 조기 간변화는 지질 대사장애로 인한 지방간으로 이중 10~50%에서 간경화증을 볼 수 있다고 한다⁵⁾.

Ethanol 투여로 유발되는 간손상의 민감도가 개체별로 상당한 차이가 있는 것은 유전 및 식이 인자에 기인할 수도 있으나 McCoy 등 (1979) 과 Strubelt (1980) 가 제시했듯이 만성적인 알코올 섭취가 다른 간독성 인자와 상호 반응하여 활성화 시키는 것에 기인할 수 있다.

한편 간이 생체 대사의 중추로서 생명유지에 필수적인 내인적 물질은 물론 화학적 발암물질을 비롯한 각종 약물과 기타 외인적 물질들을 hepatic microsomal mono-oxygenase 를 통한 대사에 의해 해독작용을 하기도 하고 어떤 경우는 독성이나 carcinogenic 특성을 형성함은 잘 알려진 바이다⁷⁾¹⁵⁾²⁸⁾.

최근 수년간의 연구에 의해 hepatic microsomal mixed-function oxidative metabolism 의 중추인 cytochrome P-450 의 여러 분자형의 존재와 이들 상이한 분자형태들의 기질특이성 및 유발 가능성이 입증되었고⁵⁾⁹⁾⁴⁸⁾, 또한 이들이 간세포에서 화학적 발암물질¹⁶⁾ 을 포함한 수많은 xenobiotics⁷⁾ 의 활성화와 해독작용에도 각각 다양한 방법으로 참여함도 이미 밝혀졌으며, 간중양에서도 역시 drug metabolizing system 이 그구성성분, 연속반응 및 유도성과 억제성에 있어서 정상 간조직과 동일함이 증명되었다¹²⁾⁴⁴⁾⁵⁴⁾.

또한 Rubin 과 Lieber (1968), Rubin 등 (1970) 이 쥐에게 ethanol 을 투여하여 hepatic microsomal cytochrome P-450 함량의 증가를 보고한 이래 Ullrich 등

(1975) 과 Sharma 등 (1979) 은 ethanol 의 cytochrome P-450 유발가능성을 밝혔고 Ohnishi 와 Lieber (1977) 는 만성 ethanol 섭취 후 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) 의 "adaptive" 증가도 cytochrome P-450 의 질적·양적 변화에 기인할 수 있다고 했다. 즉 ethanol 투여로 유발된 P-450 은 phenobarbital 이나 polycyclic hydrocarbon 등 다른 유발인자에 의해 유도된 P-450 과는 기질특이성이 다르다³⁹⁾⁵²⁾. 그러나 다양한 기질의 microsomal metabolism 에 대한 ethanol 처리효과는 아직도 정립되지 않아서 Joly 등 (1973) 이 aminopyrine 과 ethylmorphine 의 대사를 증가시킨다고 한 반면 Liu 등 (1975) 은 감소시킨다고 했으며, Strubelt (1980) 는 ethanol 전처리가 CCl₄, chloroform 및 aflatoxin 등의 간독성을 증가시킨다고 한 반면 Sato 등 (1981) 은 acetaminophen 에 의한 간독성을 방지할 수 있다고 했다.

대부분의 화학적 발암물질과 mutagen 이 생체에서 유해한 효과를 나타내기 위해서는 대사적 활성화를 필요로 하며 장기간의 알코올 투여가 독특한 기질특이성을 갖는 cytochrome P-450 을 유발시킨다는 이상의 사실을 근거로 알코올 투여로 유발된 P-450 이 강력한 환경성 발암물질의 대사적 활성을 조절하여 발암위험도를 증가시킬 수 있는지를 결정하는 것은 의의가 있다.

이에 저자는 ethanol 을 장기 투여한 흰쥐의 간조직 내 지질변화와 microsomal cytochrome P-450 및 b₅ 함량을 측정하고, 많은 종속에서 간암의 발암원으로 알려진 2-acetylaminofluorene (2-AAF) 을²³⁾²⁷⁾²⁸⁾ 모델화합물로 사용하여 알코올 투여로 유발된 P-450 의 N-OH-AAF 와 ring-OH-AAF 형성을 살펴봄으로써 2-AAF 의 발암성에 대한 장기 ethanol 투여의 영향을 증명하고자 한 바 의의 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

A. 실험동물

체중 150 g 내외의 백서 (Sprague Dowley 종) 240

마리를 암·수 동수로 다음과 같이 나누었다.

A 군: 대조군, 암·수 각 30 마리.

B 군: 15% ethanol 투여군, 암·수 각 30 마리.

C 군: 30% ethanol 투여군, 암·수 각 30 마리.

D 군: 시판 알코올 음료(알코올 함량 약 20%) 투여군, 암·수 각 30 마리.

B. 알코올 투여 방법

매일 아침 8시 식이투여전에 체중 100g당 알코올용액 3ml씩 stomach tube를 사용하여 투여하였다. 투여한 알코올량은 성인 남자 1인당(체중 60kg) 시판 알코올 음료 180~200ml 투여한 것을 기준으로 하였다. 대조군은 증류수를 투여하였다.

투여기간은 16주간으로 하고 8주에 실험동물 반수를 실험에 사용하였다.

C. 실험동물 처리

알코올용액 투여 시작후 8주와 16주 2회에 걸쳐 동물을 희생시켜(decapitation) 개복하고 간 조직을 적출하여 수분을 여지로 제거한 후 즉시 냉동보관하였다.

D. 실험기구

Potter-Elvehjem homogenizer

High speed refrigerator centrifuge: Damon/Moedel ice B-20A

Ultracentrifuge: Beckman/Model L_s-80

Spectrophotometer: Varian SP-624

Spectronic 21 Spectrophotometer: (Bausch & Lomb)

Liquid scintillation counter: Packard Tri-CARB 300 CD

E. 실험시약

[9-¹⁴C] AAF (Specific activity 40 μ ci nmoles): New England Nuclear Corp.

NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate): Boehringer Mannheim Biochemicals

Bovine serum albumin: Sigma Co.

F. 간지질 함량 측정법

1. 총 cholesterol 함량의 정량

총 cholesterol 함량의 정량은 Zak의 방법(1954)을 사용하여 다음과 같이 시행하였다.

0.1ml의 간지질용액을 취하여 25ml volumetric flask에 넣고 10ml의 methanol: chloroform의 1:

1 용액을 넣어 boiling water bath에서 기포가 일어날 때까지 가열하고 실온에서 냉각시킨 후 다시 용매로 25ml까지 채운 다음 41mm Whatman filter paper로 여과하여 그 여과액을 실험에 사용하였다. 길이 20cm 시험관 3개를 준비하여 시험관 A에는 용매만 1ml를, B에는 검체 추출액 1ml를 그리고 C에는 표준용액(1mg/ml chloroform) 1ml를 각각 넣고 다시 boiling water bath에 넣어 용매를 완전히 증발시켰다. 시험관을 실온에서 식힌 후 각 시험관에 빙초산을 2ml씩 가한다음 발색시약(FeCl₃의 빙초산 용액) 2ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 15분간 실온에 두어 반응시킨 후 파장 540nm에서 Spectronic 21 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

2. Phospholipid 함량의 정량

Phospholipid 함량의 정량은 Connerthy 등의 방법(1961)을 사용하여 다음과 같이 사용하였다.

16 × 150mm glass-stoppered tube(10ml표선 표시)에 liver homogenate 0.2ml를 넣고 5% trichloroacetic acid 5ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 원심침전 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 digestion 혼합액(d-H₂O: c-H₂SO₄: 70% perchloric acid = 2:1:1) 1ml와 glass bead를 넣어 digestion시켰다. Digestion이 끝난 후 냉각시켜 1ml 증류수를 넣고 15초 동안 가열하였다. 그후 50% sodium acetate 1ml를 넣고 10ml 표선까지 증류수를 채웠으며 25% ammonium molybdate 1ml와 p-methylaminophenolsulfate 1ml를 넣어 잘 혼합하면 15분간 방치시킨 후 Spectronic 21 Spectrophotometer를 사용하여 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Triglyceride 함량 측정

Triglyceride 함량은 Handel과 Zilvermit 법(1967)을 사용하여 다음과 같이 시행하였다.

Zak 법에(1954) 의해 추출한 용액 1ml를 제 1 시험관에 넣고 alcoholic KOH 0.5ml를 가하였다(saponified sample). 제 2 시험관에는 alcoholic KOH만 0.5ml를 넣었다(unsaponified sample). 시험관을 60~70°C water bath에 15분간 방치한 다음 0.2 N H₂SO₄ 0.5ml를 첨가하여 혼합한 뒤 알코올을 제거하였으며 이들을 완전히 냉각시켜 sodium metaperiodate 0.1ml를 첨가하여 산화반응을 중지시켰다. 요오드색이 사라진 후 chromotropic acid 5ml를 넣어 혼합한 후 100°C에서 30분간 가열하여 냉각시킨 뒤 Spectronic 21 Spectrophotometer를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

G. 간 microsome의 cytochrome 계 활성 측정법

1. Microsome 의 분리

Microsome 의 분리는 Lotlikar 등의 방법 (1967) 을 사용하여 다음과 같이 시행하였다. 절제한 간 조직은 Potter-Elvehjem homogenizer 를 사용하여 0.25M sucrose 용액으로 25 %간 균질용액을 만들어 냉동원칩기 (Damon/Model ice B-20A) 로 8,000 × g 에서 10 분간 원심분리하여 핵, mitochondria 및 조직 침전물을 제거하였다. 이 상층액을 다시 105,000 × g 에서 1 시간 동안 ultracentrifuge (Beckman/Model L₈-80) 로 microsome 을 원심분리하여 1g/ml 가 되게 0.25 M sucrose 용액으로 균질용액을 만들었다.

2. Microsome 단백질 정량

단백질 함량은 Lowry 등의 방법 (1951) 으로 발색시켜 Spectronic 21 Spectrophotometer 를 사용하여 700 nm 에서 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다.

표준용액으로는 bovine serum albumin 을 사용하였다.

3. Cytochrome P-450 활성 측정

Microsomal cytochrome P-450 함량의 측정은 Omura 와 Sato 의 방법 (1964) 으로 CO gas 에 의하여 환원된 물질의 흡광도를 spectrophotometer (Varian SP-624) 를 사용하여 490nm 와 450nm 에서 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient 는 91m M⁻¹ Cm⁻¹ 로 하였다.

4. Cytochrome b₅ 활성 측정

Cytochrome b₅ 의 활성 측정은 Smuckler 등의 방법 (1967) 에 따라 cytochrome b₅ 의 환원형과 산화형 사이의 흡광도를 424nm 와 409nm 에서 측정하였다. 이때 molar extinction coefficient 는 185m M⁻¹ Cm⁻¹ 로 측정하였다.

5. Ring-과 N-hydroxy AAF 의 측정

Ring-과 N-hydroxy AAF 의 측정은 Lotlikar 등의 방법 (1967) 에 따라 시행하였다. AAF 의 ring-

Table 1. Incubation medium for AAF hydroxylation

	mM
HEPES buffer, pH 7.8	50.0
NADPH	2.0
AAF containing 0.2 μci (9- ¹⁴ C-AAF)	0.1
Various microsomal fractions as indicated.	
Water to a final volume of 1.0ml	
(incubated in air for 30min. at 37 °C)	

과 N-hydroxylation 을 위한 incubation medium 으로 50mM HEPES buffer (pH 7.8), 0.1mM [9-¹⁴C] AAF, 2mM NADPH 및 microsomal fraction 을 넣어 37 °C 에서 30 분간 incubation 하였다 (Table 1).

Incubation 후에 각 시험관에는 4ml 의 ice cold 1 M sodium acetate buffer (pH 6.0) 를 가하여 반응을 중지시키고 즉시로 diethyl ether 를 가하여 hydroxylation 된 대사물을 추출하였다.

Ring-과 N-hydroxy AAF 는 cyclohexane : n-butanol : acetic acid : H₂O 가 18:2:2:1 인 용매를 사용하여 paper chromatography 로 분리하고 Liquid scintillation counter (Packard Tri-CARB 300CD) 로 radioactivity 를 측정 정량하였다.

실 험 결 과

A. Ethanol 및 시판 알코올음료 장기 투여 후 흰쥐 간조직내 각종 지질함량의 변화

Ethanol 및 시판 알코올음료를 16 주간 투여하면서 암·수 흰쥐의 간조직내 각종 지질의 함량을 8 주와 16 주 두차례에 걸쳐 측정한다. Table 2-a, 2-b 에서와 같다.

총 cholesterol 함량 : 암컷에 있어서 대조군 8 주 4.05 ± 0.21mg/g, 16 주 3.67 ± 0.14mg/g 에 대하여 15

Table 2-a. The contents of total cholesterol, phospholipid and triglyceride in the liver of rats 8 week treated with ethanol and a commercial liquor

Treatment	Cholesterol (mg/g liver wet wt.)		Phospholipid (mg/g liver wet wt.)		Triglyceride (mg/g liver wet wt.)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Control	4.05 ± 0.21	4.56 ± 0.11	5.85 ± 0.44	5.89 ± 0.54	3.03 ± 0.30	3.27 ± 0.17
15 % Ethanol	6.35 ± 0.47*	7.24 ± 0.26**	6.55 ± 0.60	6.24 ± 0.36	6.15 ± 0.50**	5.84 ± 0.40*
30 % Ethanol	8.78 ± 0.68**	8.15 ± 0.95**	7.05 ± 0.48	7.25 ± 0.63*	7.57 ± 0.67**	7.44 ± 0.70**
Commercial liquor	9.55 ± 0.98**	8.75 ± 0.77**	7.15 ± 0.45*	7.75 ± 0.83*	8.75 ± 0.63**	10.70 ± 1.15**

Each value represents mean ± S.D. of 15 experiments.

*Significantly different from control value P < 0.01.

**Significantly different from control value P < 0.001

Table 2-b. The contents of total cholesterol, phospholipid and triglyceride in the liver of rats 16 week treated with ethanol and a commercial liquor

Treatment	Cholesterol (mg/g liver wet wt.)		Phospholipid (mg/g liver wet wt.)		Triglyceride (mg/g liver wet wt.)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Control	3.67 ± 0.14	4.35 ± 0.16	5.65 ± 0.34	6.36 ± 0.73	3.45 ± 0.24	3.75 ± 0.21
15 % Ethanol	8.74 ± 0.51**	9.56 ± 0.33**	7.56 ± 0.53*	7.56 ± 0.48*	8.05 ± 0.63**	9.85 ± 0.25**
30 % Ethanol	9.86 ± 0.44**	10.70 ± 1.15**	7.44 ± 0.67*	7.83 ± 0.56*	8.66 ± 0.78**	11.56 ± 0.35**
Commercial liquor	10.56 ± 1.35**	11.67 ± 0.85**	6.45 ± 0.31	9.25 ± 0.90**	9.54 ± 0.57**	14.56 ± 1.35**

Each value represents mean ± S.D. of 15 experiments.

*Significantly different from control value $P < 0.01$

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

% ethanol, 30 % ethanol 및 시판 알코올음료 투여군에서 각각 8 주와 16 주에 $6.35 \pm 0.47 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 과 $8.74 \pm 0.51 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $8.78 \pm 0.68 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 과 $9.86 \pm 0.44 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $9.56 \pm 0.98 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 과 $10.56 \pm 1.35 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 로 증가하였으며, 수컷에서는 대조군 8 주 $4.56 \pm 0.11 \text{ mg/g}$ 과 16 주 $4.35 \pm 0.16 \text{ mg/g}$ 에 대하여 15 % ethanol, 30 % ethanol 및 시판 알코올음료 투여군에서 8 주 및 16 주에 각각 $7.24 \pm 0.26 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 과 $9.56 \pm 0.33 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $8.15 \pm 0.95 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 과 $10.70 \pm 1.15 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 및 $8.75 \pm 0.77 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 과 $11.67 \pm 0.45 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 로 증가하였다.

Phospholipid 의 함량 : 암컷에서 대조군 8 주와 16 주치 $5.85 \pm 0.44 \text{ mg/g}$ 과 $5.65 \pm 0.34 \text{ mg/g}$ 에 대하여 15 % ethanol, 30 % ethanol 및 시판 알코올음료 투여군에서 각각 $6.55 \pm 0.60 \text{ mg/g}$ 과 $7.56 \pm 0.53 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$), $7.05 \pm 0.48 \text{ mg/g}$ 과 $7.44 \pm 0.67 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$), $7.15 \pm 0.45 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 과 $6.45 \pm 0.31 \text{ mg/g}$ 으로 증가하였고, 수컷에서도 대조군 8 주 및 16 주치 $5.89 \pm 0.54 \text{ mg/g}$ 과 $6.36 \pm 0.73 \text{ mg/g}$ 에 대하여 각각 $6.24 \pm 0.36 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 과 $7.56 \pm 0.48 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$), $7.25 \pm 0.63 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 과 $7.83 \pm 0.56 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 및 $7.75 \pm 0.83 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 과 $9.25 \pm 0.90 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 로 증가하였다.

Triglyceride 의 함량 : 암·수 대조군 8 주와 16 주치 $3.03 \pm 0.30 \text{ mg/g}$, $3.27 \pm 0.17 \text{ mg/g}$ 과 $3.45 \pm 0.24 \text{ mg/g}$, $3.75 \pm 0.21 \text{ mg/g}$ 에 대하여 15 % ethanol 투여군에서는 각각 $6.15 \pm 0.50 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $5.84 \pm 0.40 \text{ mg/g}$ ($P < 0.01$) 과 $8.05 \pm 0.63 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $9.85 \pm 0.25 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 으로, 30 % ethanol 투여군에서는 각각 $7.57 \pm 0.67 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $7.44 \pm$

0.70 mg/g ($P < 0.001$) 과 $8.66 \pm 0.78 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $11.56 \pm 0.35 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 으로, 시판 알코올음료 투여군에서는 $8.75 \pm 0.63 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $10.70 \pm 1.15 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 과 $9.54 \pm 0.57 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$), $14.56 \pm 1.35 \text{ mg/g}$ ($P < 0.001$) 으로 각각 유의있게 증가하였다.

B. 흰쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450 및 b_5 에 대한 ethanol 및 시판 알코올음료 장기 투여의 영향

Table 3-a, 3-b 에서 보는 바와 같이 cytochrome P-450 은 암·수 대조군 8 주 치 $6.435 \pm 0.434 \text{ nmoles/mg}$, $7.135 \pm 0.573 \text{ nmoles/mg}$ 과 16 주 치 $6.169 \pm 0.344 \text{ nmoles/mg}$, $7.326 \pm 0.862 \text{ nmoles/mg}$ 에 대하여 15 % ethanol 투여군에서는 8 주에서 각각 $7.267 \pm 0.576 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.01$) 로 증가하였던 것이 16 주에서는 $5.675 \pm 0.735 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.01$), $5.573 \pm 0.845 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.001$) 로 유의있게 감소하였고, 30 % ethanol 투여군에서는 각각 8 주에서 $8.335 \pm 0.875 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.01$), $9.035 \pm 0.976 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.001$) 로 증가하던 것이 16 주에서는 $5.501 \pm 1.168 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.001$) 로 유의있게 감소하였으며, 시판 알코올음료 투여군에서도 8 주에서는 $8.785 \pm 0.991 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.001$), $9.356 \pm 0.788 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.001$) 로 증가하였던 것이 16 주에서는 $4.426 \pm 1.316 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.001$), $6.105 \pm 0.488 \text{ nmoles/mg}$ ($P < 0.01$) 로 역시 유의있게 감소하였다.

Cytochrome b_5 에 대한 변화는 암·수 대조군 8 주 치 $0.163 \pm 0.023 \text{ nmoles/mg}$, $0.176 \pm 0.011 \text{ nmoles/mg}$ 과 16 주 치 $0.169 \pm 0.058 \text{ nmoles/mg}$, $0.178 \pm 0.013 \text{ nmoles/mg}$ 에 대하여 15 % ethanol 투여군은 8 주에서 $0.177 \pm 0.030 \text{ nmoles/mg}$, $0.189 \pm 0.032 \text{ nmoles/mg}$

Table 3 -a. Effects of ethanol and a commercial liquor feeding for 8 weeks on hepatic microsomal cytochrome P-450 and cytochrome b₅

Treatment	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)		Cytochrome b ₅ (nmoles/mg protein)	
	Female	Male	Female	Male
Control	6.435 ± 0.434	7.135 ± 0.573	0.163 ± 0.023	0.176 ± 0.011
15 % Ethanol	7.267 ± 0.576*	8.437 ± 0.735*	0.177 ± 0.030	0.189 ± 0.032
30 % Ethanol	8.335 ± 0.875*	9.035 ± 0.976**	0.168 ± 0.033	0.201 ± 0.024*
Commercial liquor	8.785 ± 0.991**	9.356 ± 0.788**	0.173 ± 0.020	0.195 ± 0.044*

Each value represents mean ± S.D. of 15 experiments.
 *Significantly different from control value P < 0.01
 **Significantly different from control value P < 0.001

Table 3 -b. Effects of ethanol and a commercial liquor feeding for 16 weeks on hepatic microsomal cytochrome P-450 and cytochrome b₅

Treatment	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)		Cytochrome b ₅ (nmoles/mg protein)	
	Female	Male	Female	Male
Control	6.169 ± 0.344	7.326 ± 0.862	0.169 ± 0.058	0.178 ± 0.013
15 % Ethanol	5.675 ± 0.735*	5.573 ± 0.845**	0.160 ± 0.035	0.154 ± 0.043
30 % Ethanol	5.501 ± 1.168*	5.591 ± 1.230**	0.159 ± 0.050	0.141 ± 0.005*
Commercial liquor	4.426 ± 1.316**	6.105 ± 0.488*	0.168 ± 0.014	0.168 ± 0.063

Each value represents mean ± S.D. of 15 experiments.
 *Significantly different from control value P < 0.01
 **Significantly different from control value P < 0.001

/mg로 큰 변화가 없었고 16 주에서도 0.160 ± 0.035 nmoles/mg, 0.154 ± 0.043 nmoles/mg 으로 의의있는 변화는 없었으며, 30 % ethanol 투여군에서는 각각 8 주에 0.168 ± 0.033 nmoles/mg, 수컷이 0.201 ± 0.024 nmoles/mg (P < 0.01) 로 증가하였으나 16 주에서는 암컷은 0.159 ± 0.050 nmoles/mg 으로 큰 변화가 없었고 수컷에서는 0.141 ± 0.005 nmoles/mg (P < 0.01) 로 의의있게 감소하였으며, 시판 알코올음료 투여군에서도 8 주에 0.173 ± 0.020 nmoles/mg, 0.195 ± 0.044 nmoles/mg (P < 0.01) 로 의의있게 증가한 반면 16 주에서는 역시 0.168 ± 0.014 nmoles/mg, 0.168 ± 0.063 nmoles/mg 으로 약간 감소하였으나 통계적 의의는 없었다.

C. Ethanol 및 시판 알코올음료를 장기 투여한 흰 쥐 hepatic microsomal enzyme 의 2-AAF hydroxylation 에 대한 영향

Table 4-a, 4-b 에서 보는 바와 같이 ring-hydroxylation 은 대조군에 있어 암·수 평균치가 8 주에 0.80 ± 0.037 nmoles/mg, 16 주에서는 0.82 ± 0.

045 nmoles/mg 이던 것이 15 % ethanol 투여군에서는 8 주 치가 0.82 ± 0.043 nmoles/mg, 0.82 ± 0.047 nmoles/mg 으로 변화가 없었고, 16 주 치에 있어서도 0.80 ± 0.052 nmoles/mg, 0.87 ± 0.047 nmoles/mg 으로 변화가 없었다. 30 % ethanol 투여군은 8 주 치가 0.84 ± 0.033 nmoles/mg, 0.86 ± 0.50 nmoles/mg 으로 역시 변화가 없었으며 16 주 치에 있어서는 0.76 ± 0.041 nmoles/mg 및 0.90 ± 0.053 nmoles/mg 으로 암컷은 약간 감소 경향이었고 수컷은 약간 상승하는 경향이었으나 역시 큰 변화가 없었다. 한편 시판 알코올음료 투여군에 있어서는 8 주에 0.87 ± 0.037 nmoles/mg, 0.84 ± 0.057 nmoles/mg 이었고 16 주에서는 0.84 ± 0.047 nmoles/mg 및 0.88 ± 0.062 nmoles/mg 으로 큰 변화가 없었다.

N-hydroxylation 에 있어서는 대조군의 평균치가 암·수 공히 0.70 ± 0.068 nmoles/mg 이었고, 15 % ethanol 투여군에 있어서는 8 주에 0.84 ± 0.072 nmoles/mg 및 0.73 ± 0.053 nmoles/mg 으로 암컷에 있어서는 의의있는 증가를 보였으나 수컷에서는 큰 변화가 없었

Table 4-a. Effects of ethanol and a commercial liquor feeding for 8 weeks on the N- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene

Treatment	Ring-OH-AAF (nmoles/mg protein)		N-OH-AAF (nmoles/mg protein)	
	Female	Male	Female	Male
Control	0.80 ± 0.037		0.70 ± 0.068	
15 % Ethanol	0.82 ± 0.043	0.82 ± 0.034	0.84 ± 0.072 *	0.73 ± 0.053
30 % Ethanol	0.84 ± 0.033	0.86 ± 0.050	0.90 ± 0.069 **	0.92 ± 0.066 **
Commercial liquor	0.87 ± 0.037	0.84 ± 0.057	0.94 ± 0.070 **	0.98 ± 0.087 **

Each value represents mean ± S.D. of 15 experiments.
 *Significantly different from control value P < 0.01
 **Significantly different from control value P < 0.001

Table 4-b. Effects of ethanol and a commercial liquor feeding for 16 weeks on the N- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene

Treatment	Ring-OH-AAF (nmoles/mg protein)		N-OH-AAF (nmoles/mg protein)	
	Female	Male	Female	Male
Control	0.82 ± 0.045		0.68 ± 0.076	
15 % Ethanol	0.80 ± 0.052	0.87 ± 0.047	1.07 ± 0.094 **	0.75 ± 0.060
30 % Ethanol	0.76 ± 0.041	0.90 ± 0.053	1.04 ± 0.082 **	0.98 ± 0.077 **
Commercial liquor	0.84 ± 0.047	0.88 ± 0.062	1.19 ± 0.074 **	1.03 ± 0.097 **

Each value represents mean ± S.D. of 15 experiments.
 *Significantly different from control value P < 0.01
 **Significantly different from control value P < 0.001

다. 16 주에서는 1.07 ± 0.094 nmoles/mg, 0.75 ± 0.060 nmoles/mg 으로 역시 암컷에서만 유의하게 증가하였다.

30 % ethanol 투여군에 있어서는 8 주에 0.90 ± 0.069 nmoles/mg, 0.92 ± 0.066 nmoles/mg 으로, 16 주에는 1.04 ± 0.082 nmoles/mg 과 0.98 ± 0.077 nmoles/mg 으로 공히 유의 있는 증가가 있었다.

한편 시판 알코올음료 투여군에 있어서는 8 주에 0.94 ± 0.070 nmoles/mg 과 0.98 ± 0.087 nmoles/mg 이던 것이 16 주에는 1.19 ± 0.074 nmoles/mg 과 1.03 ± 0.097 nmoles/mg 으로 크게 증가하였다.

고 안

A. Ethanol 및 시판 알코올음료 투여후 흰쥐 간조직내 각종 지질함량의 변화

장기간의 알코올 섭취에 의한 인체 또는 동물의 간조직 변화중 가장 흔히 볼 수 있는 것은 간조직내 지방

침윤을 들 수 있으며 이는 알코올에 의한 일시적 변화일 수도 있으나 알코올성 간염 내지는 회복키 어려운 간경화증으로 될 수도 있다¹⁷⁾²⁰⁾.

본 실험에서 알코올 장기 투여로 흰쥐 간조직내 총 cholesterol 함량이 현저한 증가를 보였는데 이는 알코올 투여가 cholesterol 생합성을 현저히 증가시킨다는 Lieber 와 DeCarli (1964) 및 임 (1962) 의 보고와 같은 결과로 알코올이 간내 cholesterol 대사에 큰 영향을 미치는 것을 의미한다. 즉 cholesterol 생합성이 알코올에 자극을 받아 증가되는 endoplasmic reticulum에 의하여 왕성하여 지며 또한 알코올 섭취 후의 간내 cholesterol ester 의 축적은 microsomal basis 에서의 cholesterol 합성 증가에 의한다고 되어 있다.

Lieber 등 (1975) 은 ¹⁴C-ethanol 을 사용하여 ethanol 의 carbon skeleton 대부분이 간지질로 된다는 것을 증명하였다.

또한 본 실험에서는 문등 (1965) 과 Lieber 와 DeCarli (1964) 가 지적한 바와 같이 알코올의 장기 투여

로 간 조직내 triglyceride 함량도 현저히 증가하였으며 이는 임 (1962) 이 지적한 바와 같이 triglyceride 의 증가가 알코올 투여기간에 비례한다는 것과 같았다.

Lieber 등 (1975) 은 알코올에 의한 과다한 hepatic NADH 생성이 NADH/NAD⁺ 비를 증가시키며 이로 인하여 α -glycerophosphate 가 증가하여 지방산을 trapping 하므로 간내 triglyceride 의 축적이 일어난다고 하였다. 또한 임 (1962) 은 알코올의 연속 투여로 간조직 절편에서 triglyceride 내 acetate -1-C¹⁴의 incorporation 을 증가되며 그 비율은 알코올 투여기간에 비례한다고 보고하였다. Lieber (1978) 는 알코올을 투여한 후 조직학적으로는 간내 지방침윤의 소견을 볼 수 없을 때 이미 간내에는 triglyceride 의 축적이 시작된다고 하였다.

한편 알코올의 장기 투여가 간조직내 phospholipid 함량에 대하여는 감소시킨다²⁾ 는 보고가 있으나 저자의 실험으로는 약간 증가되는 경향임을 알았다. 간조직내 phospholipid 의 증가는 총 cholesterol 과 triglyceride 에 비하면 양적으로는 적으나 알코올 장기 투여로 간내 phospholipid 도 약간 영향을 받는 것 같다. 알코올 투여가 간내 phospholipid 함량에 큰 영향을 주지 않는 것은 알코올에 의한 지방의 동원 또는 그 매사가 원활치 못하여 choline 등과 같은 lipotropic factor 가 상대적으로 부족하므로 지방산과 triglyceride 가 phospholipid 로 원활하게 형성되지 못하기 때문이다. 따라서 간내 지방은 증가하고 phospholipid 함량은 큰 변화가 없다고 할 수 있다.

Lieber 등(1975) 은 장기 알코올 섭취에 의한 지질 대사의 장애로 야기된 알코올성 지방간이 비록 염증 상태는 아니지만 이때의 간세포의 ultrastructural feature 가 알코올성 간염과 비슷하다하여 알코올성 지방간이 알코올성 간염의 전구증상이라 하였고 또한 간경화증은 광범위한 괴사와 염증 및 pericentral sclerosis 로 특징지어지는 알코올성 간염의 진행결과라고 하였다¹⁷⁾.

B. Ethanol 및 시판 알코올음료로 장기투여가 흰쥐의 hepatic microsomal cytochrome P-450 및 b₅ 의 함량과 2-acetylaminofluorene hydroxylation 의 변화에 미치는 영향

동물에 알코올을 장기 투여하면 간세포의 smooth endoplasmic reticulum 막이 증식하며 이는 lipoprotein 생성에 관여하는 microsomal enzyme 의 활성을 증가시키고 동시에 약물대사 효소와 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) 활성을 증가시킨다¹⁷⁾.

한편 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase 및 phospholipid 로 구성된 MEOS 는 각종 알코올을 acetaldehyde 로 산화시키며 그 특징은 다른 약물대사에 포함된 hepatic microsomal hydroxylation 계와 공통된다고 하였다^(12) 36) 40) 45) 46) 47) 50).

1965 년 Orme-Johnson 과 Ziegler 가 간세포 microsomal 에 의한 ethanol 산화를 처음 보고한 이래 Joly 등 (1973) 은 만성 ethanol 투여가 MEOS 의 활성을 현저히 높이고 microsomal 내의 cytochrome P-450 과 phospholipid 의 함량 및 NADPH-cytochrome C reductase 의 활성을 증가시킨다고 하였으며, Liu 등 (1975) 은 hepatic microsomal 의 약물대사 효소에 대한 장기 ethanol 투여 효과는 복합적이며 성별, 다른 물질에 노출 여부 및 가장 중요한 것은 ethanol 투여기간과 근접 (proximity) 에 의한다고 하였다. Ohnishi 와 Lieber (1977) 는 장기 ethanol 투여한 암·수 쥐에서 MEOS 활성의 증가는 hepatic cytochrome P-450 의 양적 및 질적 변화에 의한다고 하였고 Sinclair 등 (1981) 은 알코올의 혈중농도가 급격히 상승하면 cytochrome P-450 의 증가가 가장 현저하다고 하였다.

저자의 실험결과에 의하면 투여한 알코올의 함량에 관계없이 암·수 모든 군의 흰쥐에서 hepatic microsomal cytochrome P-450 함량이 8 주까지는 유의 있게 증가추세에 있었으나 16 주까지 계속 투여한 바 감소시키는 경향으로 나타나고 있다 ($P < 0.01 \sim 0.001$).

한편 cytochrome b₅ 의 함량은 8 주나 16 주 모두에서 큰 변화가 없었다. 30% ethanol 투여군에 있어서는 암컷에서는 큰 변화가 없었으나 수컷에서는 8 주에서 증가 ($P < 0.01$) 하였다가 16 주에서는 다시 감소 ($P < 0.01$) 하는 경향이 있었다. 이 결과는 Morgan 등 (1981) 에 의한 결과와 비슷하였다. 또한 Correia 와 Mannering (1973) 은 cytochrome b₅ 도 cytochrome P-450 계에 의한 여러 기질의 hydroxylation 에서 주전자 전달자로 작용한다고 한 것이나 Ingelman-Sundberg 와 Johnson (1981) 이 reconstituted membrane vesicle 에 cytochrome b₅ 를 혼합하므로써 cytochrome P-450 dependent ethanol oxidation 을 약간 저지시켰지만 cytochrome P-450 대신 cytochrome b₅ 를 포함하는 vesicle 을 사용하므로써 ethanol 산화를 성취하여 MEOS 에 cytochrome b₅ 도 관계된다고 한 사실들을 보전테 본 실험에서 큰 변화는 없었으나 cytochrome b₅ 도 알코올 투여시 cytochrome P-450 과 관계가 있다고 생각한다.

한편 Villeneuve 등 (1976) 과 Guengerich (1978) 는

ethanol에 의해 유발된 hepatic microsomal cytochrome P-450은 phenobarbital이나 3-methylcholanthrene에 의해 유발된 cytochrome P-450과 그 촉매작용이 달라서 ethanol cytochrome P-450은 aniline hydroxylation에 더 활발하다고 하였고 Sharma 등(1979)은 ethanol-cytochrome P-450의 독특한 유발양상을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 규명하였으나 아직도 ethanol투여로 유발된 cytochrome P-450의 촉매작용에 대해서는 정확한 사실은 없다.

또한 N-acetylarylamine에 속하는 2-AAF의 hepatic microsomal cytochrome P-450-dependent mixed function oxidase를 통하여 생성된 독성 대사물(N-OH-AAF)이 강력한 간암 유발물질임은 잘 알려진 사실이며^{15) 27) 28)}, 2-AAF가 NADPH와 산소의 존재하에서 hepatic cytochrome P-450 mixed function oxidase system을 통하여 N-hydroxylation(활성화, 간독성)과 ring-hydroxylation(비활성화)으로 대사되기 때문에 cytochrome P-450의 질적·양적 변화가 2-AAF hydroxylation 과정에 영향을 미칠 것이라고 하였다^{19) 33) 49)}. 위와 같은 조건하에서 phenobarbital(Peraino 등, 1973), 3-methylcholanthrene(Lotlikar 등, 1967), 및 비타민 B 복합체(홍등, 1980)투여에 의한 AAF hydroxylation에 관한 영향에 대하여도 보고된 바 있다.

저자의 실험결과에 의하면 ethanol을 장기 투여한 흰쥐의 hepatic microsomal ring-hydroxylation에 대한 영향은 15%, 30% ethanol투여군 및 시판 알코올 음료 투여군에서는 약간 증가하는 경향이 있으나 유의있는 변화는 없음을 알았다. N-hydroxylation은 ethanol 함량에는 관계가 없는 것 같으며 암·수 모두에서 N-hydroxylation을 증가시켜서 Lotlikar 등(1967)이 3-methylcholanthrene으로 전처리한 흰쥐에서 hepatic microsomal AAF hydroxylation은 N-보다 ring-hydroxylation을 훨씬 더 증가시킨다고 한 것과는 대조적이고, phenobarbital 처치로 흰쥐에서 AAF-유발성 간종양 발생율을 높인다고 보고한 Peraino 등(1973)과는 비슷하였다. 또한 본 실험결과는 McCoy 등(1979)이 장기간 ethanol을 섭취시킨 hamster에서 ethanol이 발암물질 NPY(N-nitrosopyrrolidine)를 활성화하는 α -hydroxylation pathway를 유발할 수 있다고 한 것과 비슷하며 흰쥐에게 장기적으로 ethanol을 투여하면 2-AAF의 대사적 활성율을 증가시켜서 발암위험도를 증가시킬 수 있다는 것을 의미한다. 그러나 ethanol과 약물로 유발되는 간독성의 상호관계는 복잡적이어서 mi-

croosomal enzyme 자극으로 간독성을 나타내는 CCl_4 ^{37) 43)}, chloroform⁴³⁾ 및 aflatoxin⁴³⁾ 등의 간독성은 ethanol투여로 유발된 cytochrome P-450에 의하여 간독성이 증가되지만 acetamiophen³⁷⁾에 의한 간독성은 ethanol투여로 유발된 cytochrome P-450이 그 활성화된 대사로 biotransformation되는 것을 저지하여 간독성을 방해한다고 하였다.

한편 시판 알코올음료 투여군에서 AAF-hydroxylation 증가율이 특히 현저한 점은 시판 알코올음료에 약간 함유된 여러 화학물질이 알코올과 상승작용을 하는 것이 아닌가도 생각된다.

본 실험에서는 8주에는 cytochrome P-450 함량이 증가하면서 2-AAF의 N-hydroxylation도 증가하고 있었으나 16주에서는 cytochrome P-450 함량은 감소하는 경향이었는데 N-hydroxylation은 계속 증가경향으로 나타나고 있었다. 이점에 대하여는 Strubelt(1980)의 ethanol 전처치가 CCl_4 의 간독성을 증가시키고 있으면서 cytochrome P-450 함량은 감소되고 있다는 보고와 동일한 경향을 나타내었다.

결 론

흰쥐에 16주간 15%, 30% ethanol 및 시판 알코올음료를 일정량 투여하여 간조직내 각종 지방성분과 cytochrome P-450, cytochrome b₅ 및 AAF의 ring-및 N-hydroxylation을 8주와 16주 두 차례에 걸쳐 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 간조직내 총 cholesterol과 triglyceride함량은 장기간 ethanol투여로 증가추세에 있었으며 phospholipid함량에는 큰 변화가 없었다.

2) 간조직내 microsomal cytochrome P-450은 15%, 30% ethanol용액 및 시판 알코올음료에 있어서 8주까지는 증가하였으나 16주에서는 감소하였고, cytochrome b₅에 있어서는 큰 변화가 없었다.

3) Ethanol이나 시판 알코올음료로 처리한 간조직내의 AAF화학물의 ring-및 N-hydroxylation에 있어서는 큰 변화가 없었으나 N-hydroxylation은 계속 증가하였다.

4) 간조직내 지방함량의 증가와 cytochrome P-450 및 AAF의 N-hydroxylation과는 관계가 있다고 사료된다.

-References-

- 1) 문동진 나중은 성낙음, (1965), Alcohol투여로 인한 백서 혈청, 간조직내 지질대사 및 뇌조직내 sero-

- tonin과 microsomal oxidase 활성의 변화에 대한 연구, 현대의학, 3 : 727 - 733.
- 2) 임환철(1962), 알콜 장기투여에 의한 백서 간조직의 생화학적 변화에 관한 연구, 종합의학, 7 : 333 - 346.
 - 3) 홍영숙, 김복희, 성낙응(1980), 흰쥐 간조직내 cytochrome P-450 에 의한 2-AAF hydroxylation에 의한 각종 vitamine B 복합체의 영향, 이화의대지, 3: 113 - 118.
 - 4) Al-sarraf, M., T.S. Go, K. Kitnior, and V.K. Vaitkevicius (1974), Primary liver cancer, *Cancer*, 33: 574 - 580.
 - 5) Anthony, Y.H., S.B. West, M. Vore, D. Ryan, and W. Levin (1974), Role of cytochrome b5 in hydroxylation by a reconstituted cytochrome P-450-containing system, *J. Biol. Chem.*, 245 : 6701 - 6709.
 - 6) Connerty, H.V., B.R. Briggs, and E.H. Eaton (1961), Simplified determination of the lipid components of blood serum, *Clin. chem.*, 7 : 37.
 - 7) Conney, A.H. (1967), Pharmacological implication of microsomal enzyme induction, *Pharmacol. Rev.*, 19 : 317 - 366.
 - 8) Correia, M.A., and G.J. Mannering (1973), Reduced diphosphopyridine nucleotide synergism of the reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent mixed-function oxidase system of hepatic microsomes, *Mol. Pharmacol.*, 9: 470 - 485.
 - 9) French, J.S., F.P. Guengerich, and M.J. Coon (1980), Interactions of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, phospholipid, and substrate in the reconstituted liver microsomal system. *J. Biol. Chem.*, 255: 4112 - 4119.
 - 10) Guengerich, F.P. (1978), Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.*, 253: 7931 - 7939.
 - 11) Handel, E.U., and D.B. Zilversmit (1967), Micro-method for the direct determination of serum triglycerides, *J. Lab. Clin. Med.*, 50: 152.
 - 12) Ingelman-Sundberg, M., and L. Johansson(1981), The mechanism of cytochrome P-450-dependent oxidation of ethanol in reconstituted membrane vesicle, *J. Biol. Chem.* 256 : 6321 - 6326.
 - 13) Johnson, E.F., D.S. Levitt, U. Muller-Eberhard, and S.S. Thorgeisson (1980), Catalysis of divergent pathway of 2-AAF metabolism by multiple forms of cytochrome P-450, *Cancer Res.*, 40 : 445 - 459.
 - 14) Joly, J.G., H. Ishii, R. Tescke, Y. Hasamura, and C.S. Lieber (1973), Effect of chronic ethanol feeding on the activities and submicrosomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase and the demethylases for aminopyrine and ethylmorphine, *Biochem. Pharmac.* 22 : 1532 - 1535.
 - 15) Kaplan, E., H.R. Gutmann, and T.H. Emory (1978), Microsomal metabolism of arylamides by the rat and guinea pigs, *Biochem. Pharmacol.*, 27 : 1581 - 1589.
 - 16) Kawajiri, K., H. Yonekawa, N. Harado, M. Noshiro, T. Omura, and Y. Tagashira(1980), Immunochemical study on the role of different types of microsomal cytochrome P-450 in mutagenesis by chemical carcinogens, *Cancer Res.*, 40 : 1652 - 1657.
 - 17) Lieber, C.S. (1978), Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury, *N. Engl. J. Med.*, 298: 888 - 893.
 - 18) Lieber, C.S., and L.M. DeCarli (1964), Effect of ethanol on cholesterol metabolism, *Clin. Res.*, 12 : 274 - 280.
 - 19) Lieber, C.S., and L.M. DeCarli (1972), The role of the hepatic, microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 181 : 279 - 287.
 - 20) Lieber, C.S., R. Teschke, Y. Hasumure, and L.M. DeCarli (1975), Differences in hepatic and metabolic changes after acute and chronic consumption, *Fed. Proc.*, 34 : 2060 - 2074.
 - 21) Linder, G.T., J.N. Crook, and I. Cohn, Jr. (1974), Primary liver carcinoma, *Cancer*, 33 : 1624 - 1632.
 - 22) Liu, S.J., A.K. Ramsay, and H.J. Fallon(1975), Effect of ethanol on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in the rat, *Biochem. Pharmac.*, 24 : 369 - 377.

- 23) Lotlikar, P.D., M. Enomoto, J.A. Miller, and E.C. Miller (1967), Species variation in the N-and ring-hydroxylation of 2-AAF and effects of 3-MC pretreatment, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125 : 341 - 346.
- 24) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.L. Randall (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265 - 275.
- 25) McCoy, G., C. Chen, S. Hecht, and E. McCoy (1979), Enhanced metabolism and mutagenesis of nitrosopyrrolidine in liver fractions isolated from chronic ethanol-consuming hamster, *Cancer Res.*, 39 : 739 - 796.
- 26) McCoy, G. (1980), Differential effects of ethanol and other inducers of drug metabolism on the two forms of hamster liver microsomal aniline hydroxylase, *Biochem. pharmac.* 29 : 685 - 688.
- 27) Miller, E.C., J.A. Miller, and H.A. Hartman (1961), N-hydroxy-2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat, *Cancer Res.*, 21 : 815 - 824.
- 28) Miller, J.A. (1970), Carcinogenesis by chemicals, *Cancer Res.*, 30 : 559 - 576.
- 29) Morgan, E.T., M. Devine, and P. Skett (1981), Changes in the rat hepatic mixed function oxidase system associated with chronic ethanol vapor inhalation, *Biochem. Pharmac.*, 30: 595 - 600.
- 30) Ohnishi, K., and C.S. Lieber (1977), Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system : Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption, *J. Biol. Chem.*, 252 : 7124 - 7131.
- 31) Omura, T., and R. Sato (1964), The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.* 239 : 2379 - 2385.
- 32) Orme-Johnson, W.H., and D.M. Ziegler (1965), Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes, *Bioch Biophys. Res. Commun.*, 21 : 78 - 84.
- 33) Peraino, C., R.J.M. Fry, E. Staffeldt, and W. E. Kisielles (1973), Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-AAF-induced hepatic tumorigenesis in the rat, *Cancer Res.*, 33 : 2701 - 2705.
- 34) Purtilo, D.T., and L.S. Gottlieb (1973), Cirrhosis and hepatoma occurring at Boston city hospital (1917 - 1968), *Cancer* 32 : 458 - 466.
- 35) Rubin, E., and C.S. Lieber (1968), Hepatic microsomal enzymes in man and rats: Induction and inhibition by ethanol, *Science*, 162 : 690 - 691.
- 36) Rubin, E., H. Gang, P.S. Misra, and C.S. Lieber (1970), Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication, *Am. J. Med.*, 49 : 801 - 806.
- 37) Sato, C., and C.S. Lieber (1981), Mechanism of the preventive effect of ethanol on acetaminophen-induced hepatotoxicity, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 218 : 811 - 815.
- 38) Sato, C., M. Nakano, and C.S. Lieber (1981), Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by acute ethanol administration in the rat: Comparison with carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 218: 805 - 810.
- 39) Sharma, R.N., R.G. Cameron, E. Farber, and M.J. Griffin (1979), Multiplicity of induction patterns of rat liver microsomal mono-oxygenases and other polypeptides produced by administration of various xenobiotics, *Biochem. J.*, 182 : 317 - 327.
- 40) Sinclair, J.F., P.R. Sinclair, E.L. Smith, W. J. Bement, J. Pomeroy, and H. Bonkowsky (1981), Ethanol-mediated increase in cytochrome P-450 in cultured hepatocytes, *Biochem. Pharmac.*, 30 : 2805 - 2809.
- 41) Smuckler, E.A., E. Arrhenius, and T. Hulton (1967), 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.
- 42) Strobel, H.W., J.D. Dignam, S.E. Saine, W. F. Fang, and P.M. Fennell (1978), The drug metabolism systems of liver and liver tumors: A comparison of activities and characteristics, *Mol. & Cel. Biochem.*, 22 : 79 - 91.
- 43) Strubelt, o. (1980), Interactions between ethanol and other hepatotoxic agents, *Bioche, Pha*

- rmac., 29 : 1445 - 1449.
- 44) Sultatos, L.G., and E.S. Vesell (1980), Enhanced drug-metabolizing capacity within liver adjacent to human and rat, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 600 - 603.
 - 45) Teschke, R., Y. Hasumura, and C.S. Lieber (1974), Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system : Solubilization, isolation and characterization, Archs. Biochem. Biophys., 163 : 404 - 415.
 - 46) Teschke, R., Y. Hasumura, and C.S. Lieber (1976), Hepatic ethanol metabolism : Respective roles of alcohol dehydrogenase, the microsomal ethanol-oxidizing system, and catalase, Archs. Biochem. Biophys. 175 : 635 - 643.
 - 47) Teschke, R., F. Moreno, and A.S. Petrides (1981), Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) : Respective roles of ethanol and carbohydrates for the enhanced activity after chronic alcohol consumption, Biochem. Pharmac., 30 : 1745 - 1751.
 - 48) Thomas, P.E., A.Y.H. Lu, D. Ryan, and S.B. West (1976), Multiple forms of rat liver cytochrome P-450, J. Biol. Chem., 251 : 1385 - 1391.
 - 49) Thorgeirsson, S.S., D.J. Jellow, H.A. Sasame, I. Green, and J.R. Mitchell (1973), The role of cytochrome P-450 N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene, Mol. Pharmac., 9 : 398 - 404.
 - 50) Tobon, F., and E. Mezey (1971), Effect of ethanol administration on hepatic ethanol and drug-metabolizing enzymes and on rates of ethanol degeneration, J. Lab. Clin. Med., 77 : 110 - 121.
 - 51) Traiger, G.J., and L.P. Gabriel (1972), Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CC14 hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols, J. Pharmac. Exp. Ther., 183 : 481 - 488.
 - 52) Ullrich, V., P. Weber, and P. Wollenburg (1975), Tetrahydrofurane-An inhibitor for ethanol-induced liver microsomal cytochrome P-450, Biochem. Biophys. Res. Commun., 64 : 808 - 813.
 - 53) Villeneuve, J.P., P. Mavier, and J.G. Joly (1976), Ethanol-induced cytochrome P-450 catalytic activity after partial purification, Biochem. Biophys. Res. Commun., 70 : 723 - 728.
 - 54) Wiebel, F.J., T. Wolff, and M. Lamblotte (1980), Presence of cytochrome P-450 and cytochrome P-448-dependent monooxygenase functions in hepatoma cell lines, Biochem. Biophys. Res. Commun., 94 : 466 - 472.
 - 55) Zak, B (1954), Rapid estimation of free and total cholesterol, Am. J. Clin. Pathol., 24 : 1307 - 1313.
-