

## 알코올을 투여한 흰쥐에서 Vitamin E 투여가 Lipid Peroxidation에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍영숙 · 함윤애 · 성낙응

= ABSTRACT =

The Effects of Vitamin A and E on Lipid Peroxidation in Ethanol Administered Rat Liver Microsomes

Young Sook Hong · Yoon Ae Ham and Nak Eung Sung

Department of Biochemistry, College of Medicine Ewha Womans University

Ethanol enhances the activity of microsomal enzyme system and lipid peroxidation. We observed the effect of chronic ethanol administration on cytochrome P-450 level and lipid peroxidation in rat liver microsome.

The results were as follows:

- 1) When rats were administered with ethanol, the level of microsomal cytochrome P-450 was decreased and lipid peroxidation did not change significantly.
- 2) When vitamin A and E were added incubation medium in each group, lipid peroxidation was decreased significantly.

### 서 론

알코올은 체내 대사과정에서 알코올 그 자체 또는 알코올 대사산물이 간장에 작용하여 간손상을 일으킨다. 알코올이나 알코올성 음료를 섭취하면 hepatic triglyceride 축적을 유도하며 phospholipid와 단백질의 양적 증가, smooth endoplasmic reticulum의 증식 현상<sup>1)2)</sup>이 일어난다. 이들 증식은 cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase와 같은 효소의 증가<sup>3)4)</sup>를 동반하므로 알코올의 체내 대사를 증가시키게 된다.

흰쥐에 알코올을 투여하면 cytochrome P-450 함량이 증가하며<sup>5)6)</sup> 간장균질용액에 ethanol을 첨가하면 lipid peroxidation이 증가한다<sup>7)</sup>. 그리고  $\alpha$ -tocopherol이나 N, N'-Diphenyl-p-phenylenediamine을 흰쥐에 투여하면 ethanol에 의한 triglyceride 축적을 방지한다고<sup>8)</sup>하였다.

본 실험에서는 알코올을 투여한 흰쥐에서 cytochrome P-450 함량과 lipid peroxidation 변화 그리고 vitamin A, vitamin E를 in vitro로 주었을 때 lipid peroxidation 변화를 측정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 1) 실험동물

체중 250~300g의 흰쥐(wistar strain)을 사용하여 다음 실험군으로 나누었다.

- 제 1 실험군 : 숫컷 대조군
- 제 2 실험군 : 숫컷 15% ethanol 투여군
- 제 3 실험군 : 숫컷 시판 알코올음료 투여군
- 제 4 실험군 : 암컷 대조군
- 제 5 실험군 : 암컷 15% ethanol 투여군
- 제 6 실험군 : 암컷 시판 알코올음료 투여군

**Table 1.** The level of cytochrome P-450 in rat liver microsomes treated with ethanol

	cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	
	Male	Female
control	7.95±0.62	5.09±0.72
15% Ethanol	6.05±0.83 *	4.53±0.55 *
Commercial liquor	5.63±0.78 *	3.79±0.94 *

Each value represents mean±S.D of 6 experiments

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

\*\* Significantly different from control value  $P < 0.02$

**Table 2.** The effects of vitamin A and E on lipid peroxidation in rat liver microsomes treated with ethanol

Addition	Lipid peroxide (nmoles of malondi aldehyde/mg protein/30min)					
	Male			Female		
	Control	15% Ethanol	Commercial liquor	Control	15% Ethanol	Commercial liquor
	20.89±0.35	20.43±0.07	22.14±1.12	14.42±0.98	15.16±0.79	14.42±0.64
Vitamin A 0.1mM	5.34±0.27 *	6.69±1.25 *	4.19±1.06 *	5.33±0.92 *	4.50±0.62 *	2.66±0.46 *
"  1.0mM	4.40±0.43 *	6.06±1.95 *	4.20±0.69 *	4.66±0.70 *	4.20±0.80 *	2.10±0.25 *
"  2.0mM	3.79±1.27 *	4.72±0.77 *	3.78±0.51 *	4.21±0.22 *	3.99±0.55 *	2.44±0.33 *
Vitamin E 0.1mM	15.89±1.61 *	16.24±2.05 *	16.93±1.23 *	11.93±1.20 *	6.97±0.38 *	7.39±0.54 *
"  1.0mM	13.34±0.75 *	13.46±1.17 *	11.22±0.54 *	9.41±0.86 *	6.47±1.24 *	5.12±1.26 *
"  2.0mM	12.65±0.99 *	12.62±1.77 *	9.02±0.37 *	9.23±0.95 *	6.21±0.35 *	3.88±0.45 *

Each value represents mean ± S.D of 6 experiments

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

### 2) 투여방법

매일 15% ethanol, 시판 알코올음료(진로 주식회사제품)를 체중 100g당 0.3ml씩 3주간 stomach tube를 사용하여 경구 투여하였다. 대조군은 동량의 증류수를 투여하였다.

### 3) 실험시약

Ethanol, Vitamin A, Vitamin E: Merck Co. 제그외의 시약은 reagent grade를 사용하였다.

### 4) 실험방법

이상의 실험동물을 12시간 금식시킨 후 가벼운 ether 마취 하에서 간조직을 절제하여 ice-cold 0.25M sucrose 용액으로 균질용액을 만들어 microsome을 분리하였다. Cytochrome P-450 함량은 molar extinction coefficient  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 Omura와 Sato 방법<sup>9)</sup>에 의하여 측정하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 방법<sup>10)</sup>으로 측정하였다. Lipid peroxidation 결과는 malondialdehyde 양을 thiobarbituric acid 방법<sup>11)</sup>으로 측정하였다. Extinction coefficient  $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 malondialdehyde 양을 계산하였다.

## 실험결과

1) Ethanol 및 시판 알코올음료 투여군의 cytochrome P-450 함량

1) Ethanol 및 시판 알코올음료 투여군의 cytochrome P-450 함량은 표 1과 같다.

표 1에서 보는 바와 같이 microsomal cytochrome P-450 함량은 슛컷 15% ethanol 투여군이  $0.05 \pm 0.83 \text{ nmoles/mg protein}$  (이하 nmoles로 생략함), 슛컷 시판 알코올음료 투여군은  $5.63 \pm 0.78 \text{ nmoles}$ 로 대조군  $7.95 \pm 0.62 \text{ nmoles}$ 에 비해 의의있게 감소하였다. ( $P < 0.001$ ) 또한 암컷 15% ethanol 투여군과 암컷 시판 알코올음료 투여군도  $4.53 \pm 0.55 \text{ nmoles}$ ,  $3.79 \pm 0.94 \text{ nmoles}$ 로 대조군  $5.09 \pm 0.72 \text{ nmoles}$ 에 비해 의의있게 감소하였다 ( $P < 0.02 \sim P < 0.001$ ). 슛컷과 암컷의 cytochrome P-450 함량은 슛컷에 비하여 암컷의 함량이 전반적으로 낮았다.

2) Ethanol 및 시판 알코올음료 투여군에 vitamin A와 vitamin E를 in vitro로 투여하였을 때의 lipid peroxidation 변화

모든 실험군의 lipid peroxidation 결과는 표 2와 같다.

표 2에서 보는 바와 같이 슛컷 대조군  $20.89 \pm 0.35 \text{ nmoles}$ 에 비해 슛컷 ethanol 투여군은  $20.43 \pm 0.70 \text{ nmoles}$ 로 별 차이가 없었으며 슛컷 시판 알코올음료 투여군은  $22.14 \pm 1.12 \text{ nmoles}$ 로 대조군에 비해 약간 증가하였다. 암컷 15% ethanol 투여군은  $15.16 \pm 0.79 \text{ nmoles}$ 로 암컷 대조군  $14.42 \pm 0.98 \text{ nmoles}$ 에 비해 약간 증가하였으며 암컷 시판 알코올음료 투여군은  $14.42 \pm 0.64 \text{ nmoles}$ 로 대조군과 차이가 없었다.

대조군, 15% ethanol 투여군, 시판 알코올음료 투여군의 incubation medium에 0.1, 1.0 및 2.0 mM의 vitamin A와 vitamin E를 각각 투여하였을 때 모든 실험군의 lipid peroxidation은 의의있게 감소하였다 ( $P < 0.001$ ) 슛컷과 암컷의 lipid peroxidation은 ethanol과 시판 알코올음료 투여군 모두에서 슛컷보다 암컷이 현저히 낮았다.

## 고 찰

1) 알코올 투여가 흰쥐 간조직 microsomal cytochrome P-450 함량에 미치는 영향

Lieber 등<sup>12)</sup>의 보고에 의하면 알코올을 섭취하면 간조직에서 이를 대사시키는 microsomal oxidizing system 활성이 증가한다고 하였으며 Ishii 등<sup>13)</sup>, Joly 등<sup>3)</sup>은 흰쥐에 알코올을 장기 투여하면 microsomal cytochrome P-450 함량이 증가한다고 하였다. Ohnishi와 Lieber<sup>14)</sup>는 알코올을 장기 투여한 흰쥐에서 microsomal oxidizing system의 활성 증가는 hepatic cytochrome P-450의 양적, 질적 변화에 의한다

고 하였고 Liu 등<sup>15)</sup>은 알코올 장기 투여가 간장 약물 대사 효소에 미치는 영향은 복잡적이며 성별, 다른 물질에 노출, 특히 중요한 것은 알코올 투여기간과 알코올 섭취량에 의한다고 하였다. 그러나 김<sup>16)</sup>은 30% 알코올 용액을 투여한 흰쥐의 간장 microsomal cytochrome P-450 함량이 유의하게 감소함을 보고하였다. 본 실험결과도 알코올 투여군의 cytochrome P-450 함량이 대조군에 비해 의의있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 알코올 투여량과 투여기간에 의한 것으로 생각되어지며 앞으로 더 많은 연구를 필요로 한다.

2) 알코올을 투여한 흰쥐 간조직 microsomal cytochrome P-450 함량에 대한 vitamin A와 vitamin E에 의한 lipid peroxidation 변화

Biomembrane과 subcellular organell은 lipid peroxidation의 주요한 손상 부위가 된다. 알코올을 투여하거나 간장 균질용액에 알코올을 첨가하면 lipid peroxidation이 증가한다<sup>17)</sup>는 보고가 있으나 본 실험에서는 슛컷 시판 알코올음료 투여군과 암컷 15% ethanol 투여군만 대조군에 비해 약간 증가하였고 나머지 실험군은 변화가 없었다. 이상과 같은 결과는 저자들이 행한 실험조건에서는 microsomal lipid peroxidation에 큰 변화가 없음을 시사하는 것이다.

알코올을 투여한 흰쥐의 간조직 microsomal cytochrome P-450 함량에 대한 vitamin A를 incubation medium에 투여하였을 때 모든 실험군의 lipid peroxidation이 의의있게 감소하였고 vitamin A 농도가 증가함에 따라 감소하는 양도 증가하였다. 저자들이 전에 발표한 논문<sup>18)</sup>에서 흰쥐에 vitamin A를 경구 투여하였을 때 lipid peroxidation이 감소한다는 보고와 위 실험결과로 보아 vitamin A 강한 산화제로 작용함을 알 수 있었다.

Vitamin E는 항산화제로 작용하여 lipid peroxidation을 감소시킴으로써 microsomal membrane과 polyunsaturated fatty acid를 정상적으로 유지시킨다. Takada 등<sup>17)</sup>은 choline이 결핍된 흰쥐에서 알코올 투여 후 lipid peroxidation이 증가하는 것을 vitamin E를 투여함으로써 억제시킬 수 있었다고 보고하였고 Yoshikawa 등<sup>19)</sup>은 vitamin E가 결핍된 흰쥐에서 lipid peroxidation이 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서도 vitamin E를 각 실험군의 incubation medium에 투여하였을 때 vitamin E 농도가 증가함에 따라 모든 실험군의 lipid peroxidation이 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 위의 결과로 vitamin E는 항산화제로 작용하여 lipid peroxidation을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

## 결 론

흰쥐에 알코올 투여가 hepatic microsomal cytochrome P-450 함량과 lipid peroxidation에 미치는 영향 및 이 실험군에 vitamin A와 vitamin E를 in vitro로 투여하였을 때 lipid peroxidation을 측정할 결과는 다음과 같다.

1) 알코올 투여군의 hepatic microsomal cytochrome P-450 함량은 모든 실험군이 대조군에 비해 11%~45% 감소하였다.

2) 알코올 투여군의 lipid peroxidation은 숫컷 시판 알코올음료 투여군만 대조군에 비해 7% 증가하였고 그외의 실험군은 별 변화가 없었다.

3) 알코올 투여군의 micrososome에 0.1, 1.0, 및 2.0mM의 vitamin A를 in vitro로 투여하였을 때 lipid peroxidation은 알코올 투여군보다 65%~85%가 감소하였고 0.1, 1.0, 및 2.0mM의 vitamin E를 투여하였을 때 각 실험군의 lipid peroxidation은 알코올 투여군 보다 17%~73% 감소하였다.

## REFERENCES

- 1) Di Luzio, N.R. : Effect of acute ethanol intoxication on liver and plasma lipid fractions in the rat, *Am. J. Physiol.*, 1958; 194: 453-456
- 2) Elko, E.E., Wooles, W.R., and Di Luzio, N.R. . Alternation and mobilization of lipids in acute ethanol-induced rats, *Am. J. Physiol.*, 1961; 201: 923-926.
- 3) Joly, J.G., Ishii, H., Teschke, R., Hasumura, Y. and Lieber, C.S. : Effect of chronic ethanol 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.*, 1973; 22: 1532-1535.
- 4) Misra, P.S., Lefevre, A., Ishii, H., Rubin, E., and Lieber, C.S. : Increase of ethanol, meprobamate and phenobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and rats, *Amer. J. Med.*, 1971; 51: 346.
- 5) Rubin, E., and Lieber, C.S. : Hepatic microsomal enzyme in man and rats, Induction and inhibition by ethanol, *Science*, 1968; 162: 690-691.
- 6) Rubin, E., Gang, H., Misra, P.S., and Lieber, C.S. : Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication, *Am. J. Med.* 1970; 49: 801-806.
- 7) Comporti, M., Hartman, A.D., and Di Luzio, N. R. : Effect of in vivo and in vitro ethanol administration on liver lipid peroxidation, *Lab. Invest.*, 1967; 16: 616-624.
- 8) Di Luzio, N.R., and Costales, F. : Inhibition of ethanol and carbon tetrachloride induced fatty liver by antioxidants, *Expl. Mol. Pathol.*, 1965; 4: 141-154.
- 9) Omura, T and Sato, R. : The carbon monoxide binding pigments of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 1964; 239: 2370-2378.
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275.
- 11) Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation (Eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N.D.), *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1978, Vol. 52, pp. 302-310.
- 12) Lieber, C.S., and Decarli, L.M. : Ethanol oxidation by hepatic microsomes-Adaptive increase after ethanol feeding, *Science*, 1968; 162: 917-918.
- 13) Ishii, H., Joly, J.G., and Lieber, C.S. : Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1973; 291: 411-420.
- 14) Ohnishi, K., and Lieber, C.S. : Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system, *J. Biol. Chem.*, 1977; 252: 7124-7131.
- 15) Liu, S.J., Ramsey, R.K. and Fallon, H.J. : Effect of ethanol on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in the rats, *Biochem. Pharmacol.*, 1975; 24: 369-377.
- 16) 김종원 : 인삼과 알코올 투여가 백서 간조직내 cytochrom p-450, b<sub>2</sub> 및 2-AAF의 hydroxylation에 미치는 영향. 이화여자대학교대학원 1982년도 석사학위 청구논문.
- 17) Takada, A., Ikegami, F., Okumura, Y., Hasumura, Y., Kanayama, R. and Takeuchi, J. . Effect

of alcohol on the liver of rats., Lab Invest., 1970 ; 23 : 421-428.

- 18) 함윤애 · 홍영숙 · 성낙응 : 흰쥐에 vitamin antioxidants 투여가 lipid peroxidation에 미치는 영향, 이화의대지, 1982 ; 5 : 109-116.
- 19) Yoshikawa, T., Yokoe, N., Takemura, S., Kato,

H., Hotta, T., Matsumura, N., Ikezaki, M., Hosokawa, K. and Kondo, M.: Lipid peroxidation and lysosomal enzymes in D-galactosamin hepatitis and its protection by vitamin E, Gastroenterologia Japonica, 1979 ; 14 : 31-39.