

## 사염화탄소와 Monosodium-L-Glutamate 병용투여에 의한 간조직의 환원형글루타치온 함량 및 그의 관련효소활성의 변화

김형춘 · 이왕섭 · 전완주 · 김수희 · 주왕기

강원대학교 약학대학

(Received July 28, 1991)

### Alterations of Glutathione and Glutathione-Dependent Enzyme Activities by Monosodium-L-Glutamate in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage

Hyoung-Chun Kim, Wang-Seop Lee, Wan-Jhoo Chun, Soo-Hee Kim and Wang-Kee Jhoo  
*College of Pharmacy, Kang-weon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

**Abstract**—To explore the effect of monosodium-L-glutamate(MSG) on CCl<sub>4</sub>-damaged liver in Wister male rat, 5% MSG solution as drink water were administered after S.C. injection of 0.1 mg/kg CCl<sub>4</sub> twice a week for 4 weeks. After last administration of MSG, hepatic glutathione(GSH) dependent system was assayed. It showed that MSG increased significantly hepatic glutathione(GSH) and glutathione peroxidase(GSH<sub>px</sub>), but decreased glutathione-S-transferase(GST) activity in normal rats. MSG increased significantly the GSH<sub>px</sub> and GST activities in rats with CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. These results indicate that decrease of GSH dependent systems in CCl<sub>4</sub> liver injury might be partially elevated by coadministration of MSG.

**Keywords** □ CCl<sub>4</sub>-damaged liver, GSH dependent system, monosodium-L-glutamate.

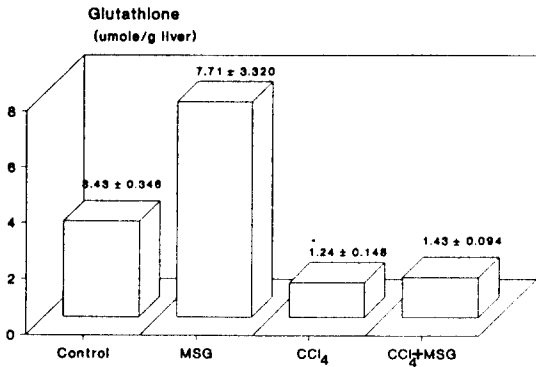
식품첨가물인 monosodium-L-glutamate(MSG)가 사지의 감각둔화, 쇠약감, 심박수의 증가 등을 주요 소견으로 하는 소위 chinese restaurant syndrome<sup>1)</sup>을 유발할 수 있다고 보고된 이후에 실험적으로도 신생 흰쥐에 MSG를 투여시 시상하부 궁상 핵(arcuate nucleus)에 손상을 주므로서 중추신경기능장애를 초래하기 때문에 MSG를 특이적인 중추신경 독성유발제로서 적용시키고 있다.<sup>2)</sup> 그러나, MSG가 간대사 과정에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 없었으나, 최근에 MSG가 혈장 및 간세포에서 케톤체를 감소시키고,<sup>3)</sup> 신생마우스에서 cytochrome P-450계 및 mixed function oxidase(MFO)계를 억제시킨다는 보고에 착안하게 되었다.<sup>4)</sup> 생체대사과정중 전반적인 MFO계가 억제된다면 그 반응성도 억제될 수 있으나, 현재까지 이러한 MSG의 작용기전을 응용한 연구는

이루어진 바 없다.

본 연구자들은 MSG 존재하에서 간독소인 사염화탄소의 반응성이 어떻게 변화되는지를 검색하기 위하여 간실질 손상상태의 방어지표인 glutathione(GSH) 및 GSH 의존성 효소활성<sup>5)</sup>을 측정하여 MSG가 glutathione 의존성 효소의 활성을 증가시키는 작용이 있었기에 이에 보고하고자 한다.

#### 실험방법

**시약 및 기기**—Monosodium-L-glutamate, carbon tetrachloride, glutathione, dichloronitrobenzene, cumene hydroperoxide, NADPH, O-phthalaldehyde, sodium azide, EDTA, sodium phosphate, potassium phosphate monobasic 등은 Sigma사에서 구입하였으



**Fig. 1**—Effect of monosodium-L-glutamate(MSG) on the glutathione(GSH) contents in liver poisoned by CCl<sub>4</sub> in rat. Each value shows mean ± S.E. of 5 to 9 experiments. \*p<0.001 vs. Control.

Male Wister rats fed with commercial chow ad libitum were used.

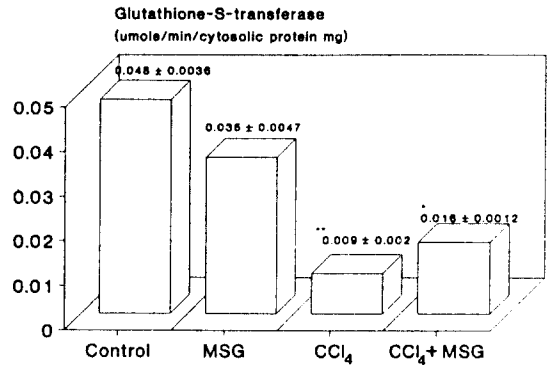
CCl<sub>4</sub>(0.1 ml/kg) as 1 : 1(v/v) mixture of olive oil(or olive oil alone as control) administered subcutaneously to the rats twice a week for 4 weeks. MSG group were given to 5% MSG solution as drinking water.

The rats of each were killed under the ether anesthesia at 18 hr after last treatment. Daily consumption of MSG in each rat was calculated as 4.24 ± 0.48 g/kg body weight.

며, 일반 시약들은 일급 및 특급시약을 사용하였다. 기기로는 분광광도계(Beckman M-35), 형광광도계(Perkin Elmer LS-3) 및 저온고속 원심분리기(Beckman J2-21) 등을 사용하였다.

**실험동물**—강원대학교 약학대학 동물 사육실에서 10일 이상 적응시킨 체중 250g 내외의 Wister계 숫컷 흰쥐를 사용하였다. 사육 실내온도 22~24°C, 12시간 썩의 주야 주기를 유지하면서 물과 사료는 제한하지 않았다.

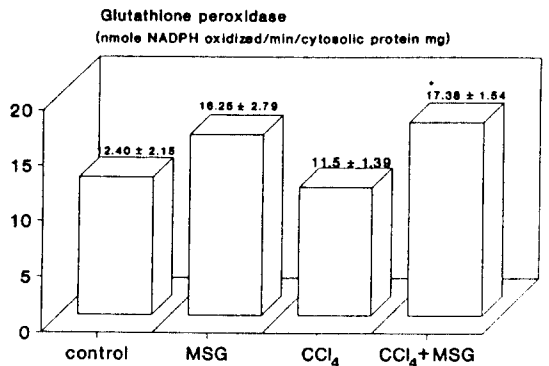
**실험군**—4군으로 하였다. 즉, Cameron 등의 방법<sup>6)</sup>에 따라 사염화탄소를 올리브유에 1 : 1로 혼합하여 녹인 사염화탄소 용액을 0.2 ml/kg씩 주 2회 4주간 피하주사한 CCl<sub>4</sub> 투여군, 5%(w/v) MSG액을 제한없이 음료수 대용으로 4주간 마시게 한 MSG 투여군, 같은 방법으로 동시에 CCl<sub>4</sub> 및 MSG를 병용투여한 군 및 용매인 올리브유를 피하주사하고 증류수를 마시게 한 정상대조군의 4군으로 나누고, 최종 투여 18



**Fig. 2**—Effect of monosodium-L-glutamate(MSG) on the activity of glutathione-S-transferase(GST) in liver poisoned by CCl<sub>4</sub> in rat. Each value shows mean ± S.E. of 5 to 9 experiments.

\*p<0.05 vs. CCl<sub>4</sub>, \*\*p<0.001 vs. Control.

For details, see the legend to Fig. 1.



**Fig. 3**—Effect of monosodium-L-glutamate(MSG) on the activity of glutathione peroxidase(GSH<sub>px</sub>) in liver poisoned by CCl<sub>4</sub> in rat. Each value shows mean ± S.E. of 5 to 9 experiments.

\*p<0.05 vs. CCl<sub>4</sub>.

For details, see the legend to Fig. 1.

시간 후에 도살하여 얻은 간의 중엽조직<sup>7)</sup>에서 환원형 glutathione(GSH)과 세포질 분획에 주로 분포된 glutathione-S-transferase(GST : EC 2.5.1.18) 및 glutathione peroxidase(GSH<sub>px</sub> : EC 1.11.1.9)를 측정하였다.

**간조직 환원형 glutathione 함량측정**—Cohn과 Lyle의 방법<sup>8)</sup>에 따라 O-phthalaldehyde가 gluta-

thione과 특이적으로 형광반응하는 원리를 이용하여 excitation 328 nm, emission 430 nm에서 형광광도계로 측정하였다.

**간세포질 glutathione-S-transferase 활성측정**—Hartig과 Pabst의 방법<sup>9)</sup>에 따라 균질화된 간조직을 4°C, 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 얻은 세포질 분획을 취한 후 이를 효소원으로 dichloronitrobenzene을 기질로 하여 345 nm에서 변화되는 흡광도를 측정하였다.

**간세포질 glutathione peroxidase 활성측정**—간조직을 인산완충액(pH 7.0)으로 균질화하고, 4°C, 10,000×g에서 원심분리한 상층액을 효소원으로 사용하였으며, Lawrence 방법<sup>10)</sup>에 따라 cumene hydroperoxide를 기질로 하여 340 nm에서 변화되는 흡광도를 측정하였다.

**단백질 함량측정**—Lowry법<sup>11)</sup>에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 측정하였다.

**통계처리**—유의성 검정은 unpaired student's t-test에 의하였다.

### 실험결과

**간조직 환원형 glutathione 함량에 미치는 영향**—MSG 투여군에서 환원형 glutathione 함량은 7.71±3.32 μmole/liver g이었는데, 이는 정상대조군(3.43±0.35 μmole/liver g)에 비하여 함량이 유의성있게 증가되었고, CCl<sub>4</sub> 간독성 유발군(1.24±0.15 μmole/liver g)은 정상대조군에 비하여 그 함량이 유의성있게 감소(p<0.001)되었다. CCl<sub>4</sub> 및 MSG를 동시에 투여시킨 군(1.43±0.09 μmole/liver g)에서는 CCl<sub>4</sub> 간독성 유발군보다 그 함량이 증가되는 경향을 보였다.

**간세포질 glutathione-S-transferase 활성에 미치는 영향**—MSG 투여군에서 간세포질 glutathione-S-transferase 활성이(0.035±0.005 μmole/min/protein mg)이었는데 이는 정상대조군(0.048±0.004 μmole/min/protein mg)에 비하여 27% 저하된 활성을 나타내었고, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발시킨 군(0.009±0.002)은 정상대조군과 비교할 때 그 활성이 유의성있게 저하(p<0.001)되었으나, CCl<sub>4</sub>와 MSG를 병용투여할 경우(0.016±0.001) 유의성있게 그 활성이 증가(p<0.05)되었다.

**간세포질 glutathione peroxidase 활성에 미치는**

**영향**—MSG 투여군에서 간세포질 glutathione peroxidase 활성(16.25±2.79 nmole DNAPH oxidized/min/protein)이 정상대조군(12.40±2.15)에 비하여 그 활성이 증가되었다. CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발(11.50±1.39)시켜도, 정상대조군에 비하여 유의성은 없었으나, CCl<sub>4</sub>와 MSG가 병용투여된 군(17.83±1.54)에서는 그 활성이 유의성있게 증가(p<0.05)되었다.

### 고찰

Newman 등<sup>12)</sup>은 MSG를 원숭이에 2g/kg 및 4g/kg의 용량으로 80일간 연속 80회 투여시에도 혈청 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase(GPT)치가 전 실험기간 동안 증가되지 않았으며, 간조직 GOT 및 GPT도 정상수준이었으며, 180일간 연장 투여하여도 현저한 변화는 나타나지 않았다고 보고하였다. 최근에 Nakai 등<sup>3)</sup>과 Fukuda 등<sup>13)</sup>은 MSG 유발 비만 흰쥐나 비만 Zucker 흰쥐의 혈장 및 간세포에서 케톤체 생성이 현저히 감소되었다고 보고하였으며 이러한 작용은 말초조직의 산화율과 관련될 수 있을 것으로 시사하였다. 한편, 지방간이 발생하는 중요한 병리기전은 간중성지방이 혈장으로 이행되는 과정이 차단되는 것인 바,<sup>14,15)</sup> MSG 투여 비만 흰쥐에서 보여지는 혈장 중성지방의 현저한 증가는 지방간의 주류인 중성지방이 혈장으로 이행될 수 있음을 증명하는 것이며, 본 연구자 등도 사염화탄소 중독간에 MSG를 투여할 때 간중성지방이 감소됨과 동시에 지방간의 조직학적 소견이 개선됨을 확인하였다.<sup>16)</sup> 고용량의 CCl<sub>4</sub>(2.5 ml/kg)를 1회 투여하더라도 1주 이내 회복되는 점<sup>17)</sup>을 고려하여 본 연구에서는 Cameron 등의 방법<sup>6)</sup>에 따라 CCl<sub>4</sub>로는 저용량에 해당하는 0.1 ml/kg을 주 2회씩 4주 투여하여 병변을 유지시켰다. 그러나, CCl<sub>4</sub> 투여군에서 보여지는 GSH<sub>px</sub>의 활성은 정상대조군과 유의차가 없는 점과, MSG 병용투여 시에는 GSH의존성 효소의 활성이 유의하게 증가하는 것과는 대조적으로 CCl<sub>4</sub> 투여군에서 보여지는 GSH 함량저하는 MSG를 병용투여하여도 유의차가 나타나지 않은 점은 계속 규명되어야 할 것이다. 간조직 중의 환원형 GSH의 저하원인으로는 산화율의 증가,<sup>18)</sup> 산화형 glutathione(GSSG)을 포함한 총 glutathione 합성 증가 및 지질과 기타 peroxide의 제거에 환원형 GSH 이

용율이 증가된 결과로 해석하는 보문<sup>18,19)</sup>들이 있다. 마우스의 경우 80% 수준의 GSH가 간에서 고갈되어 야, 비로서 반응성의 친핵성 대사물의 공유결합이 이루어지는 것을 볼때,<sup>20)</sup> 본 실험에서와 같이 CCl<sub>4</sub> 투여로 흰쥐간에서 64%의 GSH가 고갈되어도 GSH<sub>px</sub> 활성이 정상대조군 수준에 있음은 노화과정에서처럼 GSH 결핍시 GSH<sub>px</sub> 활성이 증가되는 기전과 일치되는지,<sup>18)</sup> 공유결합이 이루어지지 않은 상태에서 내인성 GSH<sub>px</sub>의 기질로 GSH가 이용되었는지는 추가적인 기전연구를 통하여 제시되어야 할 것이다.

사염화탄소 투여군에서의 GSH 함량저하와 더불어 GST의 활성저하는 CCl<sub>4</sub>의 대사물이 산화촉진제로 작용하고 있음을 의미할 수 있다. 반면에 MSG 병용 투여시에 보여지는 간세포질 GST 및 GSH<sub>px</sub>의 유의한 활성증가는 MSG가 간세포질에서 환원제로 작용할 수 있음을 시사할 수 있다고 본다. 과산화물의 분해제인 catalase가 보상성 유도(compensatory induction)를 나타내는 반면, GSH<sub>px</sub>의 경우는 거의 보상성 유도없이 작용하는 점<sup>21)</sup>으로 유추해 볼때 MSG로 인한 GSH<sub>px</sub> 활성증가는 사염화탄소 공격에 대하여 항산화체계를 구축했을 가능성을 제시한다. 한편 MSG 병용투여로 활성이 증가된 GST는 간세포질내 거대분자와 공유결합하려는 사염화탄소의 중간대사물과 포함반응 촉진에 관여할 수 있을 것이다.<sup>22)</sup> 간의 유리 glutamate는 뇌의 1/4 정도에 해당하고, 과량이 섭취되더라도 문맥순환을 거쳐 신속한 간대사가 진행<sup>23)</sup>되기 때문에 연구자 등은 본 실험조건하에서는 사염화탄소 중독간에 미치는 MSG의 작용으로 GSH 의존성 효소유도가 간손상억제화에 부분적으로 기여할 수 있다고 유추하나, 보다 정밀한 기전을 파악하기 위하여는 항산화체계에 대한 집중적인 연구가 요구된다고 생각된다.

## 결 론

Monosodium-L-glutamate(MSG)이 사염화탄소 중독간에 미치는 영향을 실험하기 위하여 Wister계 숫컷 흰쥐에게 4주 동안 5% MSG 용액을 음료수대용으로 제한없이 마시게 하면서 CCl<sub>4</sub>(0.1 ml/kg)를 주 2회씩 4주간 피하주사한 후 최종 CCl<sub>4</sub> 투여 18시간 후에 간조직의 환원형 glutathione(GSH) 함량, 간세포질의 glutathione-S-transferase(GST) 및 glutathione pe-

roxidase(GSH<sub>px</sub>) 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) MSG 투여로 정상대조군보다 GSH가 유의성있게 증가되었지만, CCl<sub>4</sub> 투여로 상승된 GSH가 MSG를 병용투여 시켰을 경우에는 유의성있는 변화가 나타나지 않았다.

2) MSG 투여로 정상대조군보다 GST의 활성이 억제되었지만, CCl<sub>4</sub> 투여로 저하된 GST 활성이 MSG를 병용투여시킬 경우 유의성있게 GST 활성이 증가되었다.

3) MSG 투여로 정상대조군보다 GSH<sub>px</sub> 활성이 증가되었고, CCl<sub>4</sub>를 투여하여도 간세포질의 GSH<sub>px</sub> 활성은 유의성있는 변화가 나타나지 않았으나, MSG를 CCl<sub>4</sub>와 병용투여시킬 경우 GSH<sub>px</sub> 활성이 유의성있게 증가되었다.

따라서 본 실험 조건하에서는 CCl<sub>4</sub> 간손상 상태에서 MSG 투여로 GSH의존성효소인 GST 및 GSH<sub>px</sub>의 활성이 항산화계의 평형에 접근할 수 있을 것으로 생각된다.

## 문 헌

- 1) Kwok, R.H.M.: Chinese-Restaurant Syndrome. *New Eng. J. Med.* **278**, 796(1968).
- 2) Burde, R.M., Schainker, B. and Kayes, J.: Acute effect of oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcuate nucleus of hypothalamus in mice and rats. *Nature*, **233**, 58 (1980).
- 3) Nakai, T., Tamai, T., Takai, S., Hayashi, R., Fujiwara, R. and Miyabo, S.: Decreased ketonemia in the monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sci.* **38**, 2009(1986).
- 4) Yamazoe, Y., Shimada, M., Murayama, N., Yamachi, K. and Kato, R.: Alteration of hepatic drug metabolizing activities and contents of cytochrome p-450 isozymes by neonatal monosodium glutamate treatment. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 1687(1988).
- 5) Douglas, K.T.: Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv. Enzymol.* **59**, 103(1987).
- 6) Cameron, G.R. and Karunaratne, W.A.E.: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regene-

- ration. *Jl. Pathol. & Bacteriol.* **42**, 1(1936).
- 7) Sipes, I.G. and Gandolfi, A.J.: Biotransformation of toxicants. Casarett and Doull's Toxicol. 3ed. Macmillan Publishing Co., N.Y. pp.84-87(1986).
  - 8) Cohn, V.H. and Lyle, J.: A fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.* **14**, 434(1966).
  - 9) Habig, W.H., Pabst, H.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130(1974).
  - 10) Lawrence, R.A., Sunde, R.A., Schwartz, G.L. and Hoekstra, W.G.: Glutathione peroxidase activity in rat lense and other tissue in relation to dietary selenium intake. *Exp. Eye Res.* **18**, 663(1974).
  - 11) Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Fan, A.L. and Randall, R.S.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265(1951).
  - 12) Newman, A.J., Heywood, R., Palmer, A.K., Barry, D.H., Edwards, F.P. and Worden, A.N.: The administration of monosodium-L-glutamate to neonatal and pregnant rhesus monkeys. *Toxicology* **1**, 197 (1973).
  - 13) Fukuda, N., Azain, M.J. and Ontko, J.A.: Altered hepatic metabolism of free fatty acid underlying hypersecretion of very low density lipoproteins in the genetically obese Zucker rat. *J. Biol. Chem.* **257**, 14066(1982).
  - 14) Lombardi, B.: Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab. Invest.* **15**, 1(1966).
  - 15) Hoyumpa, A.M., Greene, H.L., Dunn, G.D. and Schenker, S.: Fatty liver Biochemical and clinical considerations. *Dig. Dis.* **20**, 1142(1975).
  - 16) 김형춘, 이왕섭, 전완주, 최용순, 주왕기 : Effect of MSG on CCl<sub>4</sub> induced liver damage in female rat (II)-hepatic lipid levels and histology. 대한약학회 강연요지집. 986(1990).
  - 17) Nakata, R., Tsukamoto, I., Miyoshi, M. and Kojo, S.: Liver regeneration after CCl<sub>4</sub> intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 586(1985).
  - 18) Farooqui, M.Y.H., Day, W.W. and Zamorano, D.M.: Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **880**, 177(1987).
  - 19) Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T. and Takino, T.: glutathione metabolism in red cell aging. *Mechanisms Age. Dev.* **32**, 57(1985).
  - 20) Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B.: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. protective role of glutathione: *Jl. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 211(1973).
  - 21) Grankvist, K., Marklund, S.L. and Täljedal, I.B.: Cu, Zn-Superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.* **199**, 393(1981).
  - 22) Satoh, K., Kitanara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. and Sato, K.: Glutathione-S-transferase isozyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3964(1985).
  - 23) Giacometti, T.: Free and bound glutamate in natural products. ed. by Filer L.J. Raven Press, New York, pp.25(1979).