

활성산소종에 의한 알데히드 탈수소 효소의 불활성화

문전옥# · 김태완 · 백기주 · 김기현

부산대학교 약학대학

(Received October 26, 1993)

Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase by the Active Oxygen Species

Jeon-Ok Moon#, Tae-Wan Kim, Kee-Joo Paik and Ki-Heun Kim

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract—The susceptibilities of aldehyde dehydrogenase (AldDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) to active oxygen generated by xanthine-xanthine oxidase (XOD) system were studied. Incubation of AldDH with 2×10^{-3} units of XOD for 30 min at 25°C resulted in the decrease of enzyme activity to 30% and it was inactivated completely when incubated with 5×10^{-3} units of XOD. Whereas 70% of ADH activity was retained after exposure to 5×10^{-3} units of XOD for 30 min, 40% of ADH activity was retained after exposure to 5×10^{-2} unit of XOD for 30 min. This inhibition effect by the active oxygen was preventable by catalase and glutathione, but not by SOD. The rates of the NADPH-dependent oxygen consumption by the liver S-9 mixture and microsomes were also determined in this study. Rate of oxygen consumption is increased in the liver S-9 mix and microsomes from phenobarbital-treated rat, and it was consistent with increased lipid peroxidation. In the presence of ethanol as a substrate, the oxygen consumption rates were increased. It is reported that hepatic AldDH activity is depressed in alcoholic liver diseases, however there is few report that explains the reason of depressed AldDH activity. These results are supportive of the theory that the increase in hepatic ethanol oxidation through the induced MEOS activity after chronic ethanol feeding generate oxygen radical at elevated rates and it leads to the depression of AldDH activity.

Keywords □ Aldehyde dehydrogenase. alcoholic liver disease. microsomal proliferation. oxygen consumption, active oxygen species. lipid peroxidation.

정상적인 상태에서 소량의 알코올을 섭취할 경우 간장 내로 들어온 에탄올은 시토크롬 내의 알코올 탈수소 효소 (ADH)와 알데히드 탈수소 효소(AldDH)의 작용에 의해 acetate로 되어 순환계를 통해 간세포 밖으로 배설된다.¹⁾ 건강한 성인의 최대 대사량은 하루에 160~180 g인데 장기적으로 알코올을 섭취할 경우와 다량 음주 시에는 알코올성 간장해를 일으키게 되는데,²⁾ 현재 고려되고 있는 알코올성 간장해의 각종 발생 기전으로는 1)간내 [NADH]/[NAD]비의 상승,³⁾ 2)에

탄올의 주 대사산물인 아세트알데히드에 의한 간장해,^{5,6)} 3)면역기구에 의한 간장해,⁷⁾ 4)과산화지질, 활성산소 및 free radicals에 의한 장해와⁸⁻¹²⁾ 5)중심정맥역(zone 3)의 hypoxia에 의한 간세포 장해 기전을 들 수 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 이 중 특히 에탄올의 최초 대사산물인 아세트알데히드는 에탄올에 비해 월등히 반응성이 높고 독성이 강하여 알코올성 간장해의 주 원인 물질로 주목을 받고 있다.¹⁶⁾

아세트알데히드는 미토콘드리아 호흡을 방해하고 산화적 인산화 반응을 억제하며¹⁷⁻¹⁹⁾ 막단백질²⁰⁾ 및

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

콜라겐 단백질²¹⁾과도 결합하여 항체를 생성하고, 면역학적으로 세포독성을²²⁻²⁴⁾ 나타내는 외에도 간 미소관 단백질의 중합을 경쟁적으로 저해함으로써 간 미소관 양을 감소시켜, 간세포 분비 단백질의 방출 기구를 저해하는 것으로 알려져 있다.^{25,26)} 또한 아세트알데히드는 유산과 함께 myofibroblast의 콜라겐 합성을 촉진하여²⁷⁾ 간 섬유화의 촉진,^{27,28)} 간세포의 변성·종대를 일으키며 생체내 macromolecule과 반응하여 adduct를 형성하는^{25,30-34)} 이외에도 각종 효소 활성 저해와⁷⁾ glutathione 소비 등을 통한 지질과산화물 일으키는 등 다양한 간장해의 발생, 진전에 관여할 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다.^{35,36)}

간에서 아세트알데히드의 산화에 관여하는 주 효소는 NAD를 보효소로 하는 알데히드 탈수소 효소(AldDH)로서 적어도 4 종류의 isozyme이 존재함이 알려져 있지만^{37,38)} 간세포내 분포 및 생리·병태생리학적인 의의에 대해서는 충분히 검토되어 있지 않은 실정이다.^{39,40)} 장기 알콜 섭취시 아세트알데히드의 축적이 생기는데 이는 AldDH의 활성 저하로 아세트알데히드의 대사속도가 저하된 결과일 가능성이 높아졌다.^{41,42)} 아세트알데히드의 독성이 대단히 큰 사실을 고려할 때 AldDH활성의 저하는 만성 알콜 섭취로 인한 간장해 발생에 극히 중요한 역할을 할 것으로 예상되지만 만성 알콜 섭취시 AldDH활성이 저하하고 아세트알데히드가 세포내에 고농도로 축적하는 원인에 대해서는 전혀 규명되어 있지 않다. 이에 본 연구에서는 만성 알콜 섭취로 간 마이크로솨이 증식하는 사실과^{1,11,16,43)} 관련하여 MEOS(microsomal ethanol oxidizing system)활성화가 AldDH활성에 영향을 미칠 수 있는 가능성에 대해 검토하였다.

실험방법

실험시약—NADPH, NADP, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, cytochrome c, KCN, bovine serum albumin 및 acetaldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase, xanthine oxidase, xanthine, NAD 및 glutathione은 Sigma社에서 구입한 제품을 사용하였다. 일산화탄소 가스는 GL Science 제품을 사용하였으며 Na₂S₂O₄는 Katayama Chemical社 제품을

사용하였다. 2-thiobarbituric acid (TBA) 및 butylated hydroxytoluene (BHT)는 Wako pure chemical에서 구입하였으며, acetaldehyde는 Fluka AG, hydrogen peroxide는 Junsei chemical에서 구입하였고, 그 외 모든 시약들은 특급 또는 일급을 사용하였다.

Rat S-9 mixture 및 간미크로솨의 조제—체중 약 100 g전후의 Sprague-Dawley계 수컷에 phenobarbital (Na염, 80 mg/Kg 체중)을 3 일간 복강내 투여했다. 24 시간 절식시킨 후 4일째 에텔로 마취한 rat의 경동맥을 절단, 대부분의 피를 제거한 후 복부를 절개하여 하대정맥을 통하여 냉정한 1.19% KCl용액을 약 100 ml 관류시켜 간장내의 혈액을 제거했다. 적출한 간 중량의 약 4배 정도되는 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)과 함께 분쇄를 하여 9,000×g에서 20분간 원심분리 하였다. 그 상층의 일부를 S-9 mixture로 취해두고 나머지를 105,000×g에서 90분간 초원심 분리하여 미크로솨 분획을 얻었다.

Cytochrome P-450의 함량 및 NADPH-cytochrome P-450 reductase 활성 측정—cytochrome P-450의 함량은 Omura와 Sato의 방법⁴⁴⁾에 준하여 환원제의 일산화탄소색 스펙트럼에서 구했으며, NADPH-cytochrome P-450 reductase 활성은 Phillips와 Langdon의 방법⁴⁵⁾에 준하여 cytochrome c의 환원양으로부터 구했다.

단백질 정량은 BSA를 표준물질로 하여 Lowry법⁴⁶⁾에 따라 행하였다.

대조군으로 사용한 rat의 S-9 mix는 mg protein당 0.36 nmole의 P-450과 0.069 units의 reductase 활성을 함유하였고, 미크로솨 분획은 0.63 nmole의 P-450과 0.135 unit의 reductase를 함유하였다. Phenobarbital 전처리하여 조제한 S-9 mix는 mg protein당 0.66 nmole의 P-450과 0.905 unit의 reductase 활성을 함유하였고, 미크로솨 분획은 1.21 nmole의 P-450과 0.157 unit의 reductase를 함유하였다.

Xanthine-xanthine oxidase 반응계가 AldDH 및 ADH에 미치는 영향—25°C 로 항온 유지한 2 μmole의 xanthine 및 2.5 μmole의 NAD를 포함하는 50 mM 인산 완충액(pH 8.8)을 cell에 넣어 25°C 로 항온 유지한 UV스펙트로포토미터 속에서 5분간 preincubation한 뒤, AldDH(혹은 ADH)를 가하고 곧 이어 소정의 xanthine oxidase 용액을 가하여 반응시켰다. 소

정시간 incubation이 끝난 뒤, 아세트알데히드 12.5 μmole (ADH의 경우, 에탄올 20 μl)을 가하여 생성되는 NADH에 의한 340 nm의 흡광도 증가속도를 측정하여 잔존 AldDH 및 ADH의 활성을 계산하였다.⁴⁷⁾ SOD, catalase 및 glutathione의 AldDH활성 보호 효과는 xanthine oxidase첨가 전에 이들 항산화제를 가하여 검토하였다.

산소전극법에 의한 NAD(P)H 의존성 산소소비량 측정—Clark형 산소전극(Rank Brother Ltd.)를 사용하여 반응 cell내의 산소 농도 변화를 측정하였다. 0.2~8 mg의 시료 단백질을 포함하는 100 mM의 인산 완충액(pH 7.4) 1.95 ml를 37°C로 유지한 반응 cell내에 주입하여 안정화시킨 다음, syringe를 사용하여 10 mM NADPH용액 50 μl 를 가했다. 소비된 산소농도는 37°C 완충액 중의 산소 농도를 223 μM 로,⁴⁸⁾ 반응 후 포화 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 용액 100 μM 를 가했을 때의 산소농도를 0 μM 로 하여 기록계에 나타난 산소 농도 곡선으로부터 계산하였다.

Thiobarbituric acid반응물질(TBARS)의 정량—단백질 시료 1 ml(1~2 mg protein포함)에 50 mM glucose-6-phosphate 0.05 ml, 25 units/ml의 glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.05 ml 및 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4) 0.15 ml를 가해 37°C로 유지한 교반 항온조에서 2분간 preincubation시킨 뒤, 5 mM의 NADP용액 0.05 ml를 가하여 반응을 개시하였다. 10 분간 incubation시킨 후 정지액 3 ml를 가하여 반응을 중지시켰으며 NADPH의 의존성 지질과산화 생성량은 milligram protein당 생성된 TBARS의 양으로 계산하였다.⁴⁹⁾

통계처리—대부분의 실험 결과들은 평균치 표준편차로 나타내었고 두개의 서로 다른 평균치의 유의성 검정은 Student t-test로 행하였다.

결 과

xanthine-xanthine oxidase반응계에 의한 AldDH활성 저하—AldDH는 xanthine-xanthine oxidase계와 함께 incubation시켰을 경우, 그 활성이 급격히 감소함을 볼 수 있었다. Fig. 1은 2.45×10^2 Unit의 활성을 나타내는 AldDH를 xanthine oxidase 농도를 달리한 활성산소 발생계와 25°C에서 30분간 incubation할

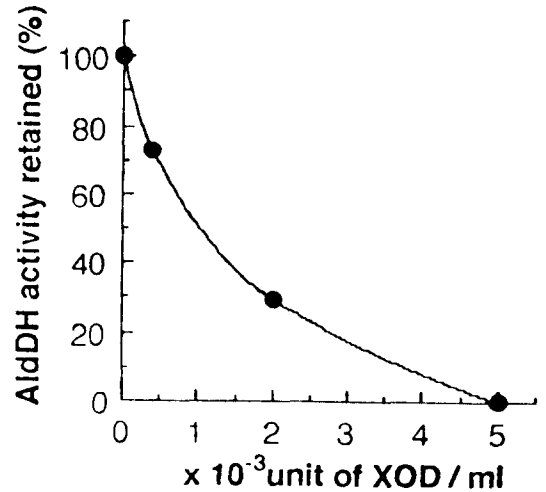


Fig. 1—Changes in aldehyde dehydrogenase(AldDH) activity after the incubation with xanthine and xanthine oxidase(XOD) system.

AldDH activity was assayed spectrophotometrically with acetaldehyde as substrate by measuring the reduction of NAD at 340 nm. The reaction mixtures contained, in a final volume of 2.5 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.8), 2.45×10^2 unit of AldDH, 5 mM of acetaldehyde, 1.0 mM of NAD^+ and 0.8 mM xanthine and XOD. The reaction mixtures except acetaldehyde were preincubated for 30 minutes at 25°C by addition of XOD as indicated and the reaction was started by addition of acetaldehyde. Each value is represented as the average of two independent determinations.

경우의 활성 저하도를 나타낸 것이다. 2.0×10^3 Unit/ml의 XOD가 공존하는 계에서의 AldDH 활성은 30%이하로 저하되었고 5.0×10^3 Unit/ml의 XOD가 공존하는 계에서 AldDH는 완전히 그 활성을 소실하였다.

xanthine-xanthine oxidase반응계에 의한 ADH활성 저하—AldDH와 같은 조건에서 ADH의 활성산소에 의한 활성 저하 정도를 측정하였다(Fig. 2). AldDH는 5.0×10^3 Unit의 XOD 공존하 30분 배양시켰을 때 활성이 완전히 소실되었음에 비해 ADH는 70% 이상 활성이 남아 있었다. XOD를 5.0×10^2 Unit로 하여 단위 시간당 발생하는 활성산소의 양을 10배 증가시킨

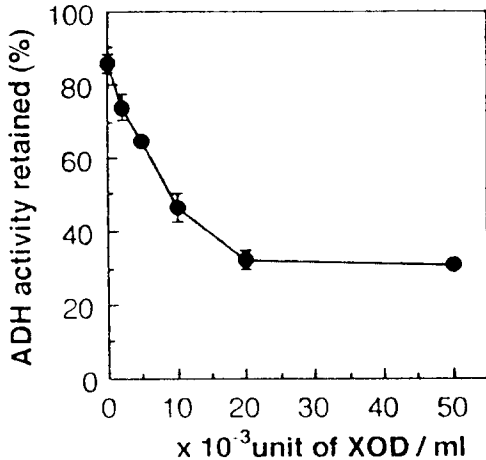


Fig. 2—Changes in alcohol dehydrogenase(ADH) activity after the incubation with X-XOD system. The reaction mixtures contained, in a final volume of 2.5 ml, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.8), 5.0×10^{-2} unit of ADH, 10 mM of alcohol, 1.0 mM of NAD^+ , and 0.8 mM xanthine and XOD. The reaction was started by addition of alcohol. Values are mean \pm S.D.(n=3).

경우에도 ADH의 잔존 활성은 대조군의 38%로 AldDH에 비해 높은 활성을 유지하였다.

X-XOD계에 의한 AldDH활성 저하에 미치는 산화계의 영향—X-XOD계에 의한 AldDH활성 저하에 미치는 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione의 영향을 검토한 결과를 Table 1에 나타내었다. 7.2×10^3 Unit의 AldDH를 2.0×10^3 Unit의 XOD공존계에서 20분간 incubation한 결과, 44%의 AldDH 활성이 잔존하였는데, 이 반응계에 SOD를 240 unit 가할 경우 AldDH 잔존 활성은 49%로서 별 차이를 보이지 않았다. 한편, catalase 100 unit를 반응계에 가함으로써 AldDH 활성은 X-XOD에 전혀 영향을 받지 않았고 glutathione을 최종 농도가 0.1 mM이 되게 가한 계에서도 X-XOD가 생성하는 활성 산소에 의한 영향이 전혀 없음을 관찰했다.

Hydrogen peroxide에 의한 AldDH의 불활성화—AldDH 활성에 영향을 미치는 H_2O_2 의 영향을 검토하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. AldDH의 활성은 1.2 mM의 H_2O_2 의 첨가로 대조군의 73% 정도의 활성

Table 1—Protective effect of catalase, SOD and glutathione on the aldehyde dehydrogenase inactivation by xanthine-xanthine oxidase system

Addition	concentration	ALDH activity retained(%)
None		44.4
catalase	100 unit	125.0
SOD	240 unit	49.0
glutathione	0.1 mM	120.0

* The reaction mixtures contained, in a final volume of 2.5 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.8), 7.15×10^{-3} unit of aldehyde dehydrogenase, 5 mM of acetaldehyde, 1.0 mM of NAD^+ , 0.8 mM xanthine and 2×10^{-3} unit of xanthine oxidase. The reaction mixtures except acetaldehyde were preincubated with xanthine-xanthine oxidase system containing the catalase, SOD or glutathione as indicated concentration for 20 minutes at 25°C and the reactions were started with an addition of acetaldehyde. Each value is represented as the average of two independent determinations

을 나타내었다. AldDH를 25°C 에서 1.2 mM의 H_2O_2 와 1분간 반응시킨 뒤, AldDH의 잔존 활성을 측정할 결과, AldDH활성은 절반 이하로 떨어졌으며 5분간 H_2O_2 에 노출시켰을 때 10% 이하의 잔존활성을 보였다(Fig. 3-a). AldDH를 25°C 에서 5분간 H_2O_2 에 노출시켰을 때, AldDH의 활성은 H_2O_2 의 농도가 증가할수록 크게 저하하였고, H_2O_2 와의 노출시간이 길수록 AldDH는 더 적은 농도의 H_2O_2 에 의해서 그 활성을 소실하였다(Fig. 3-b).

간 마이크로솜 증식과 산소소비—간 S-9 mix 및 간 마이크로솜 분획이 2 mg protein/ml의 농도로 들어있는 cell내에 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 NADPH를 가하면 반응계의 산소가 급속히 소비되었다. 이 소비속도는 PB로 유도한 간 S-9 mix 및 간 마이크로솜 분획의 경우에 더 커서 S-9 mix의 산소소비의 초속도는 대조군이 10.1, PB유도군이 20.5 $\mu\text{M}/\text{min}$ 로 PB 유도군에서 유의성있게 증가하였으며($P < 0.001$). 최종 산소소비량도 대조군의 22.3 μM 에 비해 PB유도군은 97.7 μM 로 유의성 있게 많았다($P < 0.001$)(Fig. 4-a).

한편 S-9 mix에 의한 산소소비반응은 ethanol첨가 시 더 활발하게 일어났는데 대조군의 경우 에탄올

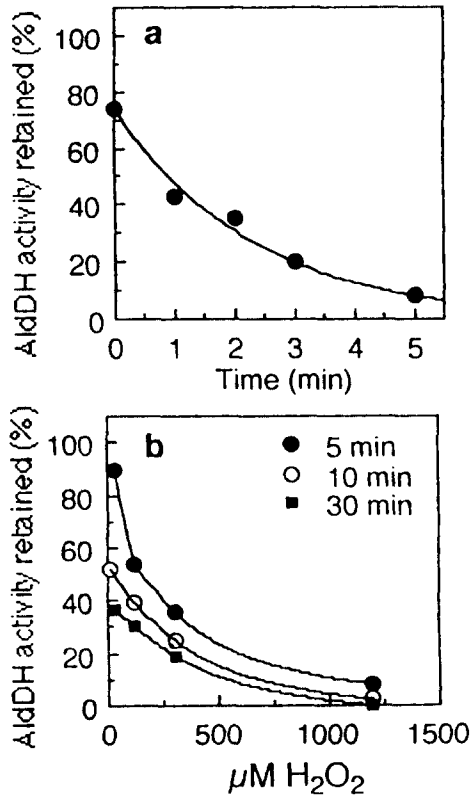


Fig. 3—Change in AldDH activity after the incubation with H₂O₂ as a function of time(a) and H₂O₂ concentration(b).

The reaction mixtures contained, in a final volume of 2.5 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.8), 4.15×10⁻³ unit of AldDH, 5 mM of acetaldehyde, 1.0 mM of NAD⁺ and 1.2 mM H₂O₂.

Each value is represented as the average of two independent determinations.

첨가로 산소 소비 반응의 초속도가 14.6 μM/min으로 145% 증가하였고(P<0.01), PB유도군은 초속도가 28.1 μM/min로 137% 증가하였다(P<0.01). 또한, 에탄올 첨가시의 산소 소비 반응도 대조군에 비해 유도군에 있어서 활발히 진행되는 것을 볼 수 있었다(P<0.05) (Fig. 4-b). 간 마이크로좀에 의한 산소 소비 반응의 초속도를 구해 Fig. 5에 나타내었다. 대조군의 초속도는 14.0 μM/min인데 비해 PB유도군의 초속도는 25.9 μM로 185% 증가하였다(P<0.05). 에탄올 첨가시 대조군의 초속도는 24.8 μM로 177% 증가를(P<0.05),

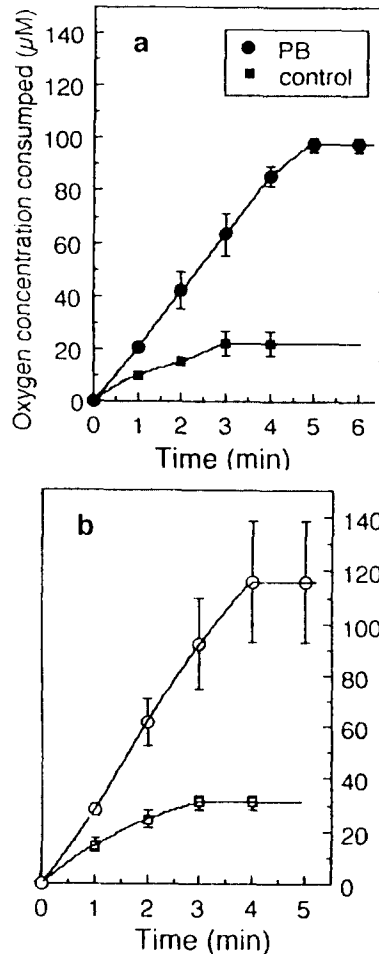


Fig. 4—Time course for the NADPH-dependent O₂ consumption reaction by the liver S-9 mix from phenobarbital-pretreated and non-treated rat with(b) and without ethanol(a). The clark-type oxygen electrode manufactured by Rank Brother was used to monitor oxygen concentration. The apparatus warmed up at 37°C. The reaction mixture contained, in a final volume of 2.0 ml, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 2.0 mg protein/ml and 0.25 mM NADPH. The reaction mixture of b contained 20 μl ethanol. The reaction was started by an addition of the NADPH solution. Values are mean± S.D.(n=3).

유도군은 35.9 μM로 139% 증가하였으며(P<0.05), 대조군에 비해 유도군에서 산소 소비 반응이 활발히

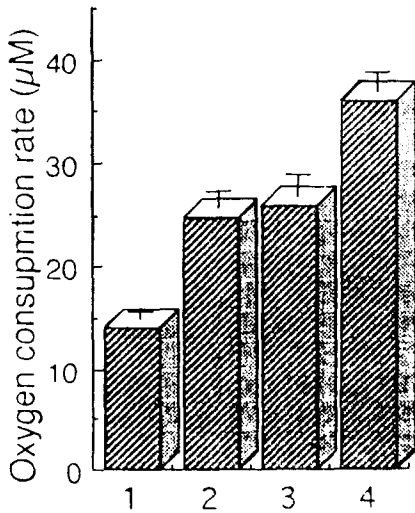


Fig. 5—NADPH-dependent oxygen consumption rate by the liver microsomes.

1 and 2: liver microsomes from control rats, 3 and 4: from phenobarbital-pretreated rats 2 and 4 contained 20 μ l of ethanol. Other conditions are the same as Fig. 4. Values are mean \pm S.D. (n=3).

진행되었다(P<0.001).

간 미크로솜 증식과 지질과산화—간 미크로솜 분획에 의한 NADPH의존성 지질과산화 결과를 Fig. 6에 나타내었다. NADPH-generating system 존재하 37°C 에서 10분간 incubation시켰을 때의 mg protein당 TBA반응물질은 대조군의 3.28 nmole에 비해 PB유도 군에서 5.40 nmole로 약165% 증가하였다(P<0.001).

고 찰

알콜 남용은 신체의 거의 모든 장기에 부작용을 나타내지만 신장이나 폐를 통해 제거되는 2~10%의 알콜을 제외한 나머지의 알콜은 모두 간에서 대사되므로 특히 간이 손상을 받기 쉽다.³⁾ 간에 미치는 알콜의 영향에 대한 막대한 양의 연구 결과가 보고되어 있음에도 불구하고 간 기능에 미치는 알콜의 영향에 대한 결과가 서로 상충되는 등 알콜성 간질환이 정확한 병인이 제대로 이해되지 않고 있다.¹⁶⁾

정상적인 상태에서나 低농도의 알콜 존재하에서 알콜은 주로 알콜 탈수소 효소(alcohol dehydroge-

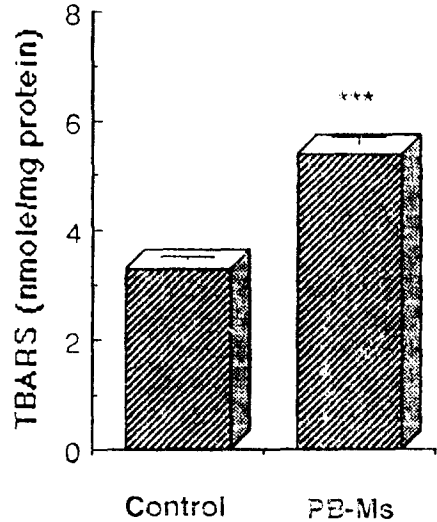


Fig. 6—The NADPH-dependent formation of TBA reactive substances in the liver microsomes from phenobarbital-pretreated(PB Ms) and control rats.

The reaction mixtures contained 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4), 2.5 mole glucose-6-phosphate, 0.25 mole NADP, 1.25 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase and the 2.0 mg of microsomal protein in a final volume of 1.3 ml. The reaction mixtures incubated for 10 minutes at 37°C. Values are mean \pm S.D. (n=3). The statistical significance was calculated vs control value, ***P<0.001

nase, ADH)에 의해 산화되어 NADH와 acetaldehyde를 생성하며 약 10%의 알콜은 분자상 산소와 NADPH 존재하 미소체 에탄올 산화계(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)를 통해 산화되어 acetaldehyde, NADP⁺ 및 H₂O을 생성한다.^{1,16)}

한편, 만성 에탄올 투여시(i)에탄올 대사는 촉진되지만 ADH활성 변화는 일어나지 않고,⁴⁾ (ii)smooth endoplasmic reticulum(SER)의 증식이 일어나며,⁵⁰⁾ (iii)cytochrome P-450 함량 증가와 함께 MEOS의 활성 증가 현상이 나타난다.^{43,51)} 또, (iv)ADH결핍 deermice의 ethanol 대사 속도가 정상 deermice의 80%에 달하며⁵²⁾ 이 동물에 알콜을 장기투여 했을 때 에탄올 대사율이 증가하며 그 활성은 MEOS활성 증가에 의한 것이라 연구결과가 보고되고 있다.^{53,54)} 이러한

사실들은 만성 에탄올 섭취 후의 에탄올 대사를 증가가 주로 MEOS활성 증가에 기인함을 보여주는 것으로서, MEOS활성 유도는 지속적인 alcohol섭취에 대한 적응과정에서 일어난 현상으로 간주된다.

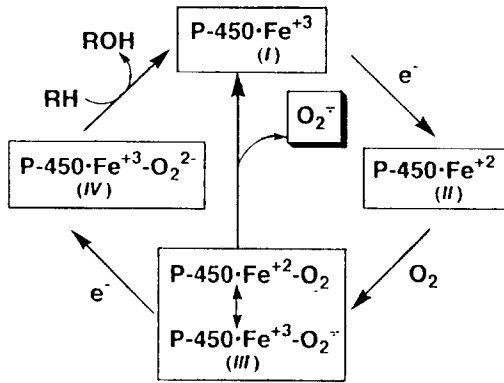
그러나 알콜이 ADH계에 의해 산화되든지 MEOS계에 의해 산화되든지 간에 그 최초 대사 산물은 아세트알데히드이며 이는 알데히드 탈수소 효소에 의해 산화된다. 아세트알데히드는 에탄올에 비해 월등히 반응성이 높고 독성이 강하여 알콜성 간질환의 주원인 물질로 주목을 받고 있다.^{5,6,16)} 한편, Palmer와 Jenkins는 알콜 상습 음용자의 AldDH활성이 정상에 비해 유의성 있게 낮음을 보고하였다.⁴¹⁾ AldDH 활성 저하로 간세포내의 아세트알데히드가 고농도로 축적되면, 미토콘드리아의 기능 장애를 초래하게 되고^{17,18)} 그 결과 아세트알데히드 산화능은 더욱 더 저하되어 간내 아세트알데히드 농도 상승이 가속되는 등의¹⁹⁾ 악순환이 거듭되어 간 기능 장애가 진전되는 것으로 여겨지고 있으나 만성 알콜 섭취시 AldDH활성이 저하하는 이유에 대해서는 전혀 규명되어 있지 않다.²¹⁾

본 연구 결과, ADH 및 AldDH가 xanthine-xanthine oxidase(X-XOD)반응계가 생성하는 활성산소에 의해 그 활성이 저하함이 밝혀졌다. 분당 5 nmole의 활성산소를 생성하는 X-XOD반응계에 25°C에서 30분간 노출시킬 때 70%의 ADH활성이 잔존하였음에 비해 AldDH활성은 완전히 소실되었고 분당 생성되는 활성산소 양을 10배로 늘인 경우에도 ADH는 38%의 잔존활성을 보임으로써 특히 AldDH는 활성산소에 대한 감수성이 큰 사실이 밝혀졌다(Fig. 1,2). X-XOD계가 생성하는 활성산소에 의한 AldDH불활성화에 SOD는 거의 효과를 나타내지 않음으로써 AldDH의 불활성화는 superoxide anion radical에 의한 것이 아님을 시사되었다. 한편, catalase는 AldDH의 불활성화 억제에 그 효과를 나타내어 AldDH의 불활성화를 진행시키는 활성산소종이 hydrogen peroxide일 가능성이 시사되었고(Table 1), AldDH에 대한 hydrogen peroxide의 영향을 검토한 결과, AldDH는 hydrogen peroxide에 의해 불활성화 되며 적은 농도의 H₂O₂로도 장시간 노출에 의해 AldDH를 불활성화 시킬 수도 있었다(Fig. 3). 간 세포내에는 끊임없이 각종 활성산소가 생성되어 oxidative stress를 가하

지만 glutathione 및 SOD, catalase, glutathione S-transferase 등이 존재하여 활성산소로부터 생체를 보호하고 있다. 그러나 생성되는 활성산소의 양이 많아지게 되면 활성산소로부터의 방어체계에 불균형이 발생, 세포는 활성산소의 피해를 입게 된다. 에탄올 투여시 간의 지질과산화 양이 증가하는 사실로¹⁰⁾ 보아 에탄올 간장해에도 지질과산화가 관여하는 것으로 보고되고 있다.^{56, 58)}

세포질의 [NADH]/[NAD]의 비는 1 이하로 산화 경향에 있는데 알콜 섭취시 ADH계에 의한 에탄올 대사는 그 보조소인 NADH를 과잉 생산하게 되어 세포질 내의 [NADH]/[NAD] 비를 증가시키고, 또 조직으로의 산소 공급이 저하될 때 1 이상이 된다고 알려져 있다. 그 결과, 이 비에 의해 조절되는 많은 산화 환원 반응에 영향을 미칠 수 있다.³⁾ 과잉 생산된 NADH에 의해 간 세포내의 과산화지질 생성량이 증가할 가능성이 phenobarbital로 유도한 rat의 간 S-9 mixture 및 microsome에 NADH를 첨가할 때 지질과산화 반응이 증가하는 사실로 보아 시사되었다.⁵⁹⁾

Svingen 등은 NADPH-cytochrome P-450 reductase를 통하여 NADPH에 의해 환원된 chelate-철과 산소의 복합체가 지질과산화를 일으킨다고 보고하였고,⁶⁰⁾ Ekstrom과 Ingelman-Sunderberg 는 NADPH, NADPH-cytochrome P-450 reductase, P-450^{LM2} 및 마이크로솜 막에서 추출한 지질로 된 재구성계에서 chelate-철이 없어도 P-450^{LM2}에 의존하는 지질과산화가 일어난다고 보고하면서 P-450이 지질과산화의 개시반응에 관여할 가능성을 시사하고 있다.^{61,62)} P-450에는 NADPH-cytochrome P-450 reductase를 통해 전자가 공급되며 이때 기질이 결합하면 P-450의 환원속도는 5~10배 정도 빨라진다.⁶³⁾ Scheme 1에 나타낸 바와 같이, 산소존재하 환원형의 P-450(II)은 즉시 산소와 결합하여 산소화형(III)이 되며 산소화형 중간체는 기질이 없을 경우 superoxide anion을 방출하고 산화형의 P-450(I)을 재생한다.⁶⁴⁾ 간 마이크로솜의 P-450의 경우 산소화형에 두번째 전자가 도입되는 단계(III→IV)가 전체 반응 cycle의 key step이며 이 반응의 속도와 산소화형의 분해속도와는 비가 전체의 coupling효율을 결정한다. 기질이 존재할 경우 산소화형에 두번째 전자가 도입된 뒤 일원자산소가 기질로 도입되고 나머지 산소원자는 물이 되어 기질 산화반



Scheme I— Generation of superoxide anion as a source of hydrogen peroxide by the autooxidation of cytochrome P-450.

응은 종결되고 산화형의 P-450 이 재생되지만 이 반응속도와 산화형의 분해속도와와의 비는 비록 기질에 따른 차이가 있지만 대략 1 : 1 정도로 보고되고 있다.⁶⁵⁾ 기질 존재하 cycle의 회전속도가 더 커지므로 실제 산소산화형 P-450의 autooxidation에 의한 활성산소 생성량은 기질 대사중에 더 많아지게 된다.

세포질내에는 NAD의 약 반량에 달하는 NADP가 존재하여 $[NADPH]/[NADP^+]$ 의 비를 높게 유지하면서 NADP를 환원상태에 있게 한다. S-9 mix 및 간미크로솜 분획에 NADPH를 가했을 때 산소 소비가 일어났는데, 산소 소비 속도는 시료 단백질의 농도에 비례하여 증가하였고 PB로 유도한 미크로솜과 S-9 mix에서 현저한 산소소비가 일어났다(Fig. 4, 5). PB 유도로 간 S-9 mix 및 간 미크로솜내의 cytochrome P-450 reductase와 cytochrome P-450량이 각각 2배 가량 증가하였는데, PB유도로 인한 NADPH 의존성 산소 소비량의 증가는 약물대사효소의 함량 증가와 좋은 일치를 보여 주었다. 간 미크로솜 분획에 NADPH를 가하였을 때 지질과산화 반응이 일어나는데, 10분 후의 NADPH의존성 TBARS 생성량은 PB유도군이 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 6). 이는 PB유도로 산소 소비가 증대하고 그 결과 생성되는 활성산소의 양이 많아지게 된 것을 의미한다. 또한 기질로 에탄올이 첨가될때 대조군과 PB유도군의 간 S-9 mix에 의한 산소소비속도가 증가됨을 볼 수 있었다. (Fig. 4, 5). 만성 알콜 섭취시에는 지속적인 알콜섭취

에 대한 생체의 적응과정에서 간 미크로솜 증식이 일어나며 cytochrome 2E1을 주축으로하는 MEOS 활성화가 일어나는 것으로 알려지고 있다.¹²⁾ 이 사실은 만성 알콜섭취로 일어나는 간 미크로솜 증식 결과 P-450의 autooxidation에 의한 활성산소 생성량이 증가할 뿐만 아니라⁵⁷⁾ 에탄올이 MEOS계에 의해 산화될 때는 superoxide 및 hydrogen peroxide의 생성량이 더욱 더 증대함을 시사한다.

만성 알콜 섭취시 활성산소의 처리제인 glutathione (GSH)의 세포내 농도가 감소하는 데³⁶⁾ 그 이유로서 Lieber는 아세트알데히드가 반응성이 높아 GSH과 직접 반응, 소비할 가능성을 보고하였고,³⁵⁾ Speisky와 Lauterburg는 아세트알데히드가 GSH의 합성을 저해하므로^{55,66)} 간세포내 GSH농도가 저하하고 그 결과 지질과산화가 일어난다고 보고하고 있다. GSH에 대한 아세트알데히드의 영향이 직접적인지 간접적인지는 아직 명백히 드러나지 않았지만 GSH가 활성산소에 의한 AldDH활성저하에 대해 보호 효과를 나타내는 것으로 보아(Table 1), 만성 알콜 섭취로 인해 간 미크로솜이 증식되면 생성되는 활성산소의 양이 많아지고 또한 에탄올의 MEOS에 의한 산화로 아세트알데히드 농도가 증대하게 될 것이다. 그 결과 GSH의 소비가 증대하여 GSH의 농도가 감소하고 AldDH의 활성은 더욱 더 저하되어 아세트알데히드는 고농도로 축적되는 악순환이 반복될 가능성이 시사되었다.

한편, 간 미크로솜 증식으로 간내 산소 소비가 활발해지는 것으로 보아 알콜 만성 섭취시 간 미크로솜 증식으로 간세포가 지속적인 hypoxia 상태로 될 수 있음이 시사되었다. 이는 만성 알콜 섭취시의 간세포괴사가 특히 간 미크로솜 증식이 두드러지는 중심 소엽부위에서 일어난다는 사실과도 일치한다. 간 미크로솜 증식으로 산소 요구량이 많아져서 간세포의 특정 구역이 저산소 상태로 놓이게 될때 xanthine dehydrogenase는 xanthine oxidase로 변하게 된다.²⁾ 알콜 대사 산물인 아세트알데히드가 다량 존재할때 xanthine oxidase는 이를 기질로 하여 활성산소를 더욱 더 발생시키고⁵⁶⁾ 이는 MEOS계를 통해 생성된 활성산소와 아울러 간내를 더욱 oxidative stress에 놓이게 할 가능성이 있다.

아세트알데히드를 산화하는 AldDH는 활성산소, 특히 hydrogen peroxide에 의해 현저히 활성을 소

실하는데, 만성 알콜 섭취로 간 마이크로솜 증식을 통한 간세포내의 oxidative stress가 커지면 AldDH 활성이 저하하고 그 결과 간세포내에 고농도로 축적되는 아세트알데히드가 높은 반응성과 독성으로 인해 다양한 간장해의 발생 및 진전에 관여할 가능성이 제시되었다.

결 론

Aldehyde dehydrogenase(AldDH) 및 alcohol dehydrogenase는 xanthine-xanthine oxidase 반응계가 생성하는 활성산소에 의해 그 활성이 저하하였는데 특히 AldDH는 감수성이 커서 5×10^3 unit XOD에 25°C 에서 30분간 노출시킬 때 완전히 그 활성을 소실하였다.

AldDH 불활성화에 SOD는 전혀 효과를 나타내지 않으나 catalase는 AldDH의 불활성화 억제에 그 효과를 나타내며 AldDH가 hydrogen peroxide에 의해 불활성화 되는 사실로부터 AldDH의 불활성화를 진행시키는 활성산소종이 superoxide anion radical이 아니라 hydrogen peroxide일 가능성이 시사되었다.

한편 PB로 유도한 간 마이크로솜 증식으로 NADPH 의존성 산소소비속도 증대와 지질과산화량의 증가가 일어났으며 알콜 존재하 단위시간당 산소소비속도는 더 증대함을 관찰하였다. 이는 산소 활성화를 통하여 생체방어를 목적으로 기능하는 cytochrome P-450유도가 간세포에 oxidative stress를 가하며 부분적인 hypoxia 상태로 만들수 있음을 뜻하며 만성 알콜 섭취시 일어나는 간 마이크로솜 증식도 이와 같은 결과를 나타낼 것으로 사료된다.

만성 알콜 섭취로 간 마이크로솜 증식이 일어나면 활성산소의 생성이 많아져서 AldDH 활성이 저하하고 그 결과 고농도로 축적되는 acetaldehyde가 높은 반응성과 독성으로 인해 다양한 간장해의 발생, 진전에 관여할 가능성이 시사되었다.

문 헌

1) Lieber, C. S.: Alcohol and the liver, 1984 update, *Hepatology* **4**, 1243 (1984).
 2) Sato, N. and Hijioka, T.: Mechanism of alcoholic

liver injury, in *Metabolism and Disease* **26**, 1087 (1989).
 3) Lieber, C. S.: Alcohol, protein metabolism and liver injury, *Gastroenterology* **79**, 373 (1980).
 4) Salaspuro, M. P., Shaw, S., Jayatilleke, E., Ross, W. A. and Lieber, C. S.: Attenuation of ethanol-induced hepatic redox change after chronic alcohol consumption: Mechanism and metabolic consequences. *Hepatology* **1**, 33. (1981).
 5) Nicholls, R., Jersey, J., Worrall, S. and Wilce, P.: Modification of protein and other biological molecules by acetaldehyde; Adduct structure and functional significance, *Int. J. Biochem* **24**, 1899 (1992).
 6) Von Burg R. and Stout T.: Toxicology update: Acetaldehyde *J. Appl. Toxicol.* **11**, 373 (1991).
 7) Kennedy, N. P. and Tipton, K. F.: Ethanol metabolism and alcoholic liver disease *Essays in Biochemistry* **25**, 137 (1990).
 8) Shimada, O., Yasuda, H. and Takamori, S.: Production of active oxygen in microsomes in *Active oxygen-Molecular Mechanism of its Production Scavenging and Effect in Organism*, ed. Nakano, M., Asada, K., and Oyanagui, Y, p 85.(1988).
 9) Shaw, S.: Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 541 (1989).
 10) Matsumura, T., Suetmatsu, T., Sato, N., Kamada, T. and Abe, H.: Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in man. *Adv. Exp. Med. Biol.* **132**, 287 (1980).
 11) Castillo, T., Koop, D. R., Kamimura, S., Triadafilopoulos, G. and Tsukamoto, H.: Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride-and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* **16**, 992 (1992).
 12) Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M.: Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducibile cytochrome P-450(P-450IIE1). *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1313 (1989).
 13) Cotterill, L. A., Gower, J. D., Clark, P. K., Fuller, B. J., Thorniley, M. S., Goddard, J. G. and Green, C. J.: Reoxygenation following hypoxia stimulates

- lipid peroxidation and phosphatidylinositol breakdown in kidney cortical slices. *Biochem Pharmacol* **45**, 1947 (1993).
- 14) Tsukamoto, H., Cavallaro, G., Peppin, J. F. and Townner, S. J.: Blood ethanol level correlates with liver pathology and gradient of oxygen tension from portal to hepatic vein. *Hepatology* **6**, 1189 (1986).
 - 15) Israel, Y., Orrego, H. and Khanna, J.M.: Alcohol induced susceptibility to hypoxic liver damage: Possible role in the pathogenesis of alcohol liver disease? In: *Alcohol and the liver*, edited by M. M. Fisher and J. G. Rankin, Plenum, New York, p. 323 (1977).
 - 16) Weiner, F. R., Czaja, M. J. and Zern, M. A.: Ethanol and the liver in the liver *Biology and Pathology*, ed. Arias, M., Jakoby, W., Popper, H., Strachter D., and Shafritz, D. A. Raven Press Ltd., New York, p.1169 (1988).
 - 17) Koch, O. R., Rotta, L. L., Bolanos, L. P. and Stoppani, O. M.: Ultrastructural and biochemical aspects in liver mitochondrial during recovery from ethanol-induced alteration. *Am. J. Pathol.* **90**, 325 (1978).
 - 18) Arai, M., Leo, M. A., Masayuki, N., Gordon, E. R. and Lieber, C. S.: Biochemical and morphological alteration of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption. *Hepatology* **4**, 165 (1984).
 - 19) Lindros, K. O.: Acetaldehyde-its metabolism and role in the action of alcohol. In: *Research advance in alcohol and drug problem*, edited by Israel, Y. Glaser, F. B. Kalant, H. Popham, R. E. Schmidt, W. Smart, R. G., p.111 (1978).
 - 20) Lumeng L., Minter R. and Li T. K.: Distribution of stable acetaldehyde adducts in blood under physiological conditions. *Fedn. Proc.* **41**, 765 (1982).
 - 21) Koskinas, J., Kenna, J. G., Bird, G. L., Alexander, G. J. M. and Williams, R.: Immunoglobulin a antibody to a 200-kilodalton cytosolic acetaldehyde adduct In Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* **103**, 1860 (1992).
 - 22) Zetterman, R. K.: *Autoimmune manifestation of alcoholic liver diseases*, ed. Kravitt, K. I. and Wiesner, R.H. Raven Press, New York, p.247 (1991).
 - 23) Takase, S., Tsutsumi, M., Kawahara, H., Takada, N. and Takada, A.: The alcohol-altered liver membrane antibody and hepatitis C virus infection in the progression of alcoholic liver disease. *Hepatology* **17**, 9 (1993).
 - 24) Yokoyama, H., Ishi, H., Nagata, S., Kato, S., Kamegaya, K. and Tsuchiya, M.: Experimental hepatitis induced by ethanol after immunization with acetaldehyde adducts. *Hepatology* **17**, 14 (1993).
 - 25) Xu, D. S., Jennett, R. B., Smith, S. L., Sorrell, M. F. and Tuma, D. J.: Covalent interactions of acetaldehyde with the actin/microfilament system. *Alcohol Alcohol* **24**, 281 (1989).
 - 26) Baraona, E., Pikkarainen, P., Salaspuro, M., Finkelman, F. and Lieber C. S.: Acute effects of ethanol on hepatic protein synthesis and secretion in the rats. *Gastroenterology* **79**, 104 (1980).
 - 27) Pawlica, E., Bankowski, E. and Sobolewski K.: Chronic intoxication with acetaldehyde stimulates collagen biosynthesis in rat liver. *Arch. Toxicol.* **65**, 678 (1991).
 - 28) Friedman, S. L.: Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis: Fuel to the fire, but not the spark. *Hepatology* **12**, 609 (1990).
 - 29) Savolainen, E. R., Leo, M. A., Timpl, R. and Lieber, C. S.: Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblast.
 - 30) Barry, R. E.: Alcohol-mediated liver damage. *G.I. Futures Clin. Practice.* **4**, 4 (1989).
 - 31) Donoue, T. M., Jr, Tuma, D. J. and Sorrell, M. F.: Acetaldehyde adducts with proteins: binding of [¹⁴C]acetaldehyde to serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**, 239 (1983).
 - 32) Lieber, C. S.: Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 241 (1988).
 - 33) Fernandez-Checa, J. C., Ookhtens, M. and Kaplowitz, N.: Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. *J. Clin. Invest.* **80**, 57 (1987).
 - 34) Jornvall, H., Hoog, J.-O., Bahr-Lindstrom, H. V., Johansson, J., Kaiser, R. and Persson, B.: Alcohol dehydrogenases and aldehyde dehydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 223 (1987).

- 35) Behrens, U. J., Hoerner, M., Lasker, J. M. and Lieber, C. S.: Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P-450IIE1 in vivo. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **154**, 584 (1988).
- 36) Jennett, R. B., Sorell, M. F., Saffari-Fard, A., Ocker, J. L. and Tuma, D. J.: Preferential covalent binding of acetaldehyde to the α -chain of purified rat liver tubulin. *Hepatology* **9**, 57 (1989).
- 37) Jukkola, A. and Niemela, O.: Covalent binding of acetaldehyde to type III collagen. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **159**, 361 (1989).
- 38) Smith, M.: Molecular genetic studies on alcohol and aldehyde dehydrogenase: individual variation, gene mapping and analysis of regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 227 (1987).
- 39) Enomoto, N., Takase, S., Takase, N. and Takada, A.: Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. *Hepatology* **13**, 1071 (1991).
- 40) Takase, Shujiro, Takada A: Alcohol and acetaldehyde metabolism and liver injury. *Metabolism* **28**, 431 (1991).
- 41) Palmer, K. R. and Jenkins, W. J.: Aldehyde dehydrogenase in alcoholic subjects *Hepatology* **5**, 260 (1985).
- 42) Zorzano, A., Arbol, L. R. and Herrera, E.: Effect of liver disorders on ethanol elimination and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in liver and erythrocytes. *Clinical Science* **76**, 51 (1989).
- 43) Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Penttila, K. E., Glaumann, H. and Lindros, K. O.: Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (2E1) in rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 55 (1988).
- 44) Sato, R. and Omura, T.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379 (1964).
- 45) Phillips, A. H. and Langdon, R. G.: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase; Isolation characterization and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **273**, 2652 (1978).
- 46) Lowry, O. H., Rosebrough, N. R., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 47) Crow, K. E., Cornell, N. W. and Veech, R. L., In: Alcohol and aldehyde metabolizing system., Vol.III. Thurman, R. G., Williamson, J. R., Drott, H. R. and Chance, B. ed., Academic Press, p 335 (1977).
- 48) Takahara, E. Ohta, S. and Hirobe, M.: Effect of oxygen concentration on the metabolic pathway of anisole in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol* **35**, 541 (1986).
- 49) Shah, S. V., Price, L. and Baricos, W. H.: Adriamycin induced stimulation of superoxide anion production in renal cortical microsomes. *Clin. Res.* **30** **836A** (1982).
- 50) Iseri, O. A., Lieber, C. S. and Gottlieb, L. S.: The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am. J. Pathol.* **48**, 535 (1966).
- 51) Lieber, C. S. and De Carli, L. M.: Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* **245**, 2505 (1970).
- 52) Shigeta Y, Nomura F, Leo M. A. et al: Ethanol metabolism in vivo by the microsomal ethanol oxidizing system in deermice lacking alcohol dehydrogenase(ADH). *Biochem. Pharmacol* **33**, 807 (1984).
- 53) Handler, J. A., Koop, D. R., Coon, M. J., Takei, Y. and Thurman, R. G.: Identification of P-450_{ALC} in microsomes from alcohol dehydrogenase-deficient deermice: Contribution to ethanol elimination in vivo, *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 114 (1988).
- 54) Alderman, J., Kato, S. and Lieber, C. S.: The microsomal ethanol oxidizing system mediates metabolic tolerance to ethanol in deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 33 (1989).
- 55) Lauterburg, B. H., Davies, S. and Mitchell, J. R.: Ethanol suppresses hepatic glutathione synthesis in rats in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**, 7 (1984).
- 56) Fridovich, I.: Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radical Biology & Medicine* **7**, 557 (1989).
- 57) Shaw, S.: Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* **7**, 541 (1989).
- 58) Cederbaum, A. I.: Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alco-

- hol metabolism and toxicity, *Free Radical Biology & Medicine* **7**, 559 (1989).
- 59) Moon, J.-O.: Cytochrome P-450-induced lipid peroxidation and oxygen consumption of the liver. *Pusan Bull. Pharm. Sci.* **27**, 38 (1993).
- 60) Svingen, B. A., Buege, J. A., O'Neal F. O. and Aust, S. D.: The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **254**, 5892 (1979).
- 61) Winston, G. W. and Cederbaum, A. I.: NADPH-dependent production of oxy radicals by purified components of the rat liver mixed function oxidase system. *J. Biol. Chem.* **258**, 1514 (1983).
- 62) Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M.: Mechanism of lipid peroxidation depended upon cytochrome P-450_{LM2}. *Eur. J. Biochem.* **158**, 195 (1986).
- 63) Imai, Y., Sato, R. and Iyanagi, T.: Rate-limiting step in the reconstituted microsomal drug hydroxylase system. *J. Biochem.* **82**, 1237 (1977).
- 64) Sligar, S. G., Lipscomb, J. D., Debrunner, P. G. and Gunsalus, I. C.: Superoxide anion production by the autooxidation of cytochrome P-450_{cam}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 290 (1974).
- 65) Kuthan, H., Tsuji, H., Graf, H., Ulrich, V., Werringer, J. and Estabrook, R. W.: Generation of superoxide anion as a source of hydrogen peroxide in a reconstituted monooxygenase system. *FEBS Lett.* **91**, 343 (1978).
- 66) Speisky, H., MacDonald, A., Giles, G., Orrego, H. and Israel, Y.: Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration, Turnover studies. *Biochem. J.* **225**, 565 (1985).