한국환경위생학회지(1993), 제19권 제2호
Kor. J. Env. Hlth. Soc. (1993), Vol. 19, No. 2 pp. 69~77

原 著

Ethanol을 前処理한 흰쥐의 肝 및 血清 Xanthine Oxidase 活性에 미치는 四塩化炭素의 影響

윤종국† · 김병렬* · 이상일**
계명대학교 자연과학대학 공중보건학과
*대구직할시 보건환경연구원, **계명전문대학 식품영양과

Effect of Carbon Tetrachloride Administration on the Serum and Liver Xanthine Oxidase Activity in Ethanol-Pretreated Rats

Chong-Guk Yoon†, Byung-Ryul Kim* and Sang-Il Lee**
Department of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
**Institute of Health & Environment Taegu City*
***Department of Food & Nutrition, Keimyung Junior College*

ABSTRACT

In the present study, the comparison of liver damage in carbon tetrachloride (CCl_4)-treated rats with that those pretreated with ethanol and an effect of liver injury on the serum and liver xanthine oxidase (XOD) activity were evaluated. The increasing rate of liver weight per body wt., the levels of serum alanine aminotransferase, and the decreasing rate of hepatic glucose-6-phosphatase activity and the protein contents in the liver cell were higher in carbon tetrachloride-treated animals pretreated with ethanol than the carbon tetrachloride-treated group. Especially, the histopathological findings also showed more severe liver damage in the ethanol-pretreated rats than the rats treated with carbon tetrachloride only. In such a experimental condition the xanthine oxidase activity of serum and liver both of carbon tetrachloride-treated rats and those pretreated with ethanol were higher than that of each control group. And the increasing rate of xanthine oxidase enzyme activity to the control group was higher in carbon tetrachloride-treated group pretreated with ethanol than those treated with CCl_4. In addition, the heptic uricase activity and the serum levels of uric acid were more increased in carbon tetrachloride-treated group pretreated with ethanol than those in the CCl_4-treated rats. On the other hand, there were no statistical differences in hepatic catalase and glutathione S-transferase activities between the CCl_4-treated rats and those pretreated with ethanol. In conclusion, it is assumed that the more severe liver damage in ethanol pretreated rats would be due to oxygen free radical produced by the xanthine oxidase system.

Keywords : Carbon tetrachloride (CCl_4), ethanol, xanthine oxidase (XO)

I. 서 론

최근 경제성장으로 국민의 식생활은 향상되고[1] 있으나 주류의 섭취증가[1]와 아울러 산업의 급속한 발전으로 야기된 공해물질에의 폭로가 인간의 건강을 위태롭게 하고 있다. 특히 이들 공해물질 중 xenobiotic성 간독성물질에 의한 간손상시 ethanol의 투여는 이들 물질의 독작용을 더욱 상승시키는[2,3] 것으로 알려져 있다.

Xanthine oxidase(XOD)는 생체내에서 purine, pyrimidine, pteridine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서

virus[4], 세균[5], 기생충[6] 등의 감염 및 alcohol[7]과 간독소[8,9]에 의해서도 XOD의 활성이 간조직과 혈액 중에서 증가될 뿐만 아니라 생체내에서 녹성물질에 대한 방어기전에도 관여할 것이라는 보고[9]도 있다.

한편, xenobiotic의 일종이며 간독소인 사염화탄소(이하 CCl_4라 약함)[10,11]는 조직세포내 활면내형질세망(smooth endoplasmic reticulum; SER)의 복합산화기구(mixed function oxidase system)에 의하여 free radical(trichloromethyl; CCl_3)로 전환되어 생체막의 과산화를 야기시킴으로써 조직손상을 일으키는 것[12-14]으로 알려져 있으며, CCl_4에 의한 급성 간손상시에도 간 및 혈청 중 XOD의 활성이 증가된다[8,9]고 보고된 바 있다.

본 연구에서는 실험동물에 ethanol을 전처리한 다음 CCl_4를 투여하여 CCl_4의 간손상에 ethanol이 어떠한 영향을 미치는지 관찰함과 동시에 이의 원인을 확인하고자 간 및 혈청 XOD의 활성변동을 추정하여 간손상의 정도와 상호관련성을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 체중 80 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 시중에서 구입한 동물사료(진양사료주식회사 제품)로 1개월간 사육하여 사용하였다.

각 실험군은 대조군, CCl_4 투여군, ethanol 투여군, ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군으로 분리, 수용하였으며 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

급성 간손상은 Rubin 등[15]의 방법에 준해 체중 100 g당 50% CCl_4(olive oil로 희석)를 0.1 ml씩 1일 1회 2일간 복강내로 주사하여 야기시켰으며, ethanol은 Cohen 등[16]의 방법에 준해 50%(v/v) 용액을 체중 100 g당 0.2 ml씩 CCl_4 주사 2시간 전에 복강내로 주사하였다. 대조군은 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였으며, 동물은 실험전 24시간 동안 물만주고 금식시켰다.

동물의 처치는 ether로 마취시킨 다음 복부정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하고 4℃의 생리식염수로 간을 관류하여 간내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다.

2. 효소시료의 조제

간조직은 일정량을 절취하여 4배량의 0.25 M sucrose액을 가하고 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄균질액(20%(w/v))을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음 그 상청액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻었다. 한편 mitochondria 분획을 제거시킨 상청액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻고, 효소활성 측정의 조효소원으로 사용하였다.

한편 채취한 혈액은 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 곧 실험에 사용하였다.

3. 효소활성도 측정

혈청 및 간조직 cytosol 분획의 XOD 활성도 측정은 Della Corte 등[17]의 방법 및 Yoon[18]의 방법에 준하였고, 간 cytosol 분획의 ADH 활성도 측정은 Bergmeyer 등[19]의 방법에 준하였다. 간조직 중 mitochondria 분획의 catalase 활성도 측정은 Aebi[20]의 방법에 준하였고 간조직 중 microsome 분획의 glucose-6-phosphatase(G-6-Pase) 활성은 Hasushi 등[21]의 방법 및 Fiske와 Subbarow[22]의 방법에 준하여 측정하였다. 한편 간 cytosol 분획의 glutathione S-transferase(GST) 활성도 측정은 Habig 등[23]의 방법에 준하였고 간조직 mitochondria 분획의 uricase 활성도 측정은 Mahler[24]의 방법에 준하였다. 그리고 혈청 alanine aminotransferase(ALT)의 활성도는 Reitman과 Frankel[25] 방법에 준해 조제된 kit 시약으로 측정하였다.

4. 간조직의 병리조직검사

10% formalin에 고정된 조직편을 paraffin에 포매하여 4 μm의 두께로 박절하고 hematoxylin-eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였으며, 전자현미경의 관찰은 조직작출 즉시 2.5% glutaraldehyde에 전고정한 후 0.05 M cacodylate buffer(pH 7.4)로 세정한 다음 1% OsO_4에 후고정하였다. 이어 동일 buffer로 세정 후 alcohol-propylene oxide계열로 탈수를 거쳐 Epon 812에 포매하고 60～70 nm의 section을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 관찰하였다.

5. 간조직의 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등[26]의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 측정하였다.

6. 혈청 요산의 정량

Table 1. Changes of ethanol and CCl_4 treatment on the liver weight, hepatic protein content in rats

Treatment	Liver weight[1]	Protein[2]		
		Mitochondria	Cytosol	Microsomal
Control	3.10± 0.08	64.15± 3.05	126.58± 3.27	79.72± 3.74
CCl_4	4.00± 0.16***[a]	57.20± 5.10	97.75± 5.04***[a]	49.43± 5.83**[a]
EtOH	3.28± 0.08	61.82± 3.01	109.58± 7.11	67.79± 4.37
EtOH−CCl_4	4.44± 0.11***[a,c,*b]	47.12± 2.41**[a,c]	87.17± 3.69***[a,*c]	45.01± 2.42***[a,c]

The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean± S.E. of 6 rats.
[a]Significantly different from control.
[b]Significantly different from CCl_4.
[c]Significantly different from ethanol.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.
[1]% of body weight, [2]mg/g·wet liver.

Table 2. Effect of ethanol and CCl_4 treatment on the liver microsomal G-6-Pase and serum ALT activities in rats

Treatment	G-6-Pase (nmoles Pi/mg protein/min)	ALT (Karmen unit/ml of serum)
Control	8.58± 0.63	31.8± 1.6
CCl_4	2.78± 0.54***[a]	245.0± 19.2***[a]
EtOH	4.25± 0.56***[a]	42.0± 1.5***[a]
EtOH+CCl_4	0.98± 0.17***[a,*b],***[c]	517.5± 24.9***[a,b,c]

The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean± S.E. of 6 rats.
[a]Significantly different from control.
[b]Significantly different from CCl_4.
[c]Significantly different from ethanol.
*p<0.05, ***p<0.001.

혈청의 요산 정량은 urea-alkali와 phosphotungstate를 가하여 발색된 색조를 비색정량하는 Yonetani 등[27]의 방법에 준해 정량하였다.

이상 실험결과의 통계처리는 student's t-test[28]를 이용하여 상호 비교하였다.

III. 성 적

1. Ethanol과 CCl_4 투여에 의한 간중량 및 단백질의 함량변동

CCl_4 투여군 및 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군 공히 대조군에 비하여 간무게가 모두 유의한 증가를 보였으며, 그 증가율은 ethanol 전처리한 군이 CCl_4 투여군보다 높게 나타났다. 그러나 ethanol 투여군과 대조군 사이에는 별다른 변동을 볼 수 없었다.

한편 간조직의 각 분획별 단백질의 함량 변동은 mitochondria 분획에서 CCl_4 투여군이 대조군에 비해 약간 감소되는 경향을 보였으며 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 대조군에 비하여 약 27% 정도의 유의한 감소를 보여, 그 감소율은 ethanol 전처리군이 CCl_4 투여군보다 더 높게 나타났다.

Cytosol 분획과 microsome 분획 모두에서 CCl_4 투여군과 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군 공히 대조군에 비하여 현저한 감소를 보였다. 한편 단백질 함량 감소율은 모든 분획에서 ethnol 전처리군이 CCl_4 투여군 보다 대조군에 비해 높게 나타났으나 간세포의 세 분획 모두 ethnol 투여군과 대조군 사이에는 유의한 변동을 관찰할 수 없었다(Table 1).

2. Ethanol과 CCl_4 투여에 의한 G-6-Pase와 혈청 중 ALT 활성도 변동

Ethanol과 CCl_4 투여시 간조직 중 microsomal G-6-Pase의 활성은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 감소하였으나 그 감소율은 ethanol을 전처리한 다음 CCl_4를 투여한 군에서 가장 높게 나타났다.

또한 혈청 중 ALT 활성은 CCl_4 투여군에서 대조군 보다 약 8배의 현저한 증가를 보였고, ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 대조군에 비해 약 15배의 현저한 증가를 보여, ethanol 전처리군이 CCl_4 투여군 보다 증가율이 높게 나타났다. 그러나 ethanol만 투여한 군에서는 대조군에 비해 약 30%의 유의한 증가를 보였으나 타군에 비해 그 증가율은 현저히 낮았다(Table 2).

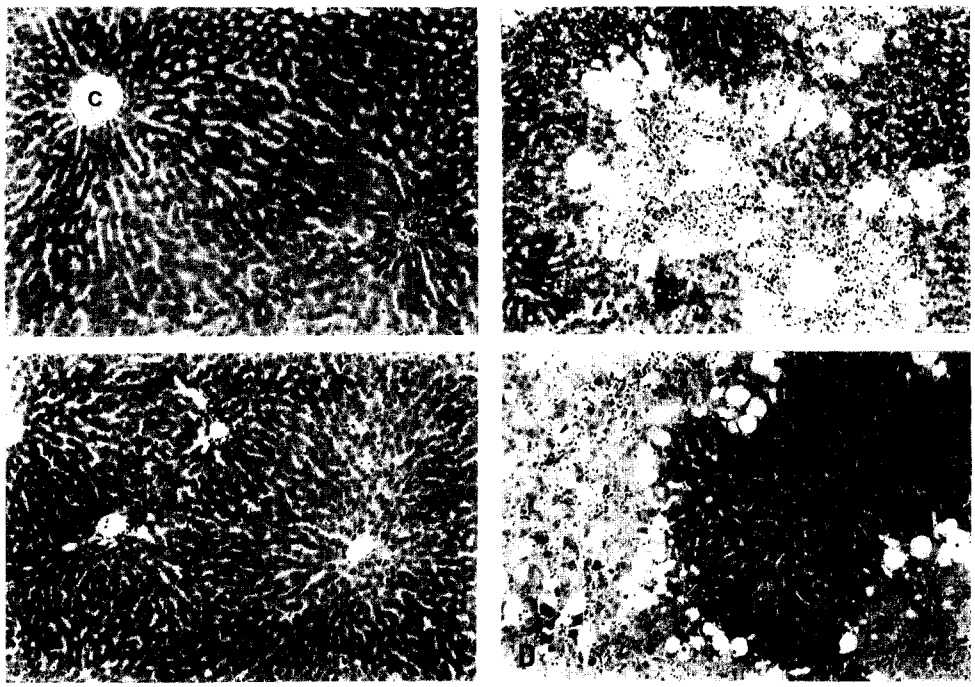

Fig. 1. Photomicrographs of hepatic tissue in rat (Hematoxylin and eosin stain, ×100).
A. Liver section from control rat. The liver structure is essentially normal. C; central vein, P; portal triad.
B. Liver section from rat treated with CCl_4. Necrosis is apparently showed with the numerous vacuole in the centrolobular portion.
C. Liver section from rat treated with ethanol. Hepatic tissue is similar to control rat.
D. Liver section from rat pretreated with ethanol and CCl_4. Centrolobular necrosis is more progressed than only CCl_4 treated rat.

3. 간조직의 병리조직 검사

광학현미경적 관찰(Fig. 1)을 행하였을 때 olive oil만을 주사한 대조군은 간소엽 내 중심정맥(central vein) 주위의 세포들이 비교적 잘 보존되어 있으며 ethanol 투여군은 대조군과 비교해 별다른 차를 관찰할 수 없다. 그러나 CCl_4 투여군은 중심정맥 주위에 괴사세포(necrosis cell)들이 관찰되고 지방소적들이 나타났다. 한편 etanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 CCl_4만을 투여한 군에서 관찰되는 증상들이 더욱 심한 것을 관찰할 수 있다.

또한 전자현미경을 통한 미세구조적 관찰(Fig. 2)을 행하였을 때, 대조군은 mitochondria, 조면소포체(RER), 담낭세관(bile canaliculi) 등의 소기관들이 정상적으로 잘 보존되어 있는 반면, CCl_4 투여군은 보다 큰 지방소적(lipid droplet)과 증식된 활면소포체(SER)들이 관찰되며 조면소포체에서 파괴된 ribosome들이 관찰되고 있다. 그리고 ethanol 투여군은 세포질내에서 심한 지방소적들이 관찰되며, ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 괴사세포에서 핵융해(karyolysis)가 일어남과 동시에 RER은 완전히 파괴되었고 다수의 공포와 응축된 지방소적들을 관찰할 수 있다.

4. Ethanol과 CCl_4 투여에 따른 간조직 및 혈청 XOD 활성도 변동

간조직 XOD의 활성은 대조군에 비해 CCl_4 투여군이 36%, ethanol 투여군은 25%, ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 52%의 유의한 증가를 보였으며, 특히 ethanol 전처리 후 CCl_4를 투여한 실험군이 타군에 비해 증가율이 크게 나타났다.

한편 혈청 XOD는 ethanol 투여군은 대조군에 비해 감소되는 경향을 보였으며, CCl_4 투여군은 대조군에 비해 약 66% 정도의 유의한 증가를 보였고, ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 대조군에 비해 63

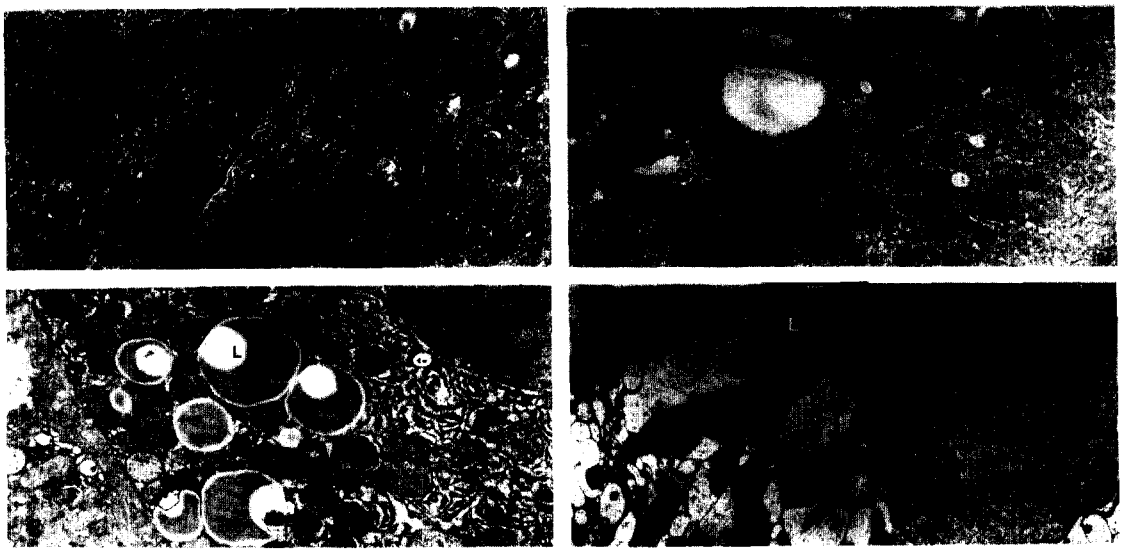

Fig. 2. Electron micrographs of hepatic tissue in rat (Uranyl acetate and lead citrate stain, ×10,000).
A. Portion of hepatocytes from control rat. Mitochondria (M), Rough endoplasmic reticulum (RER), and bile canaliculi (BC) are preserved in the cell.
B. Portion of hepatocytes from rat treated with CCl_4. Larger lipid droplet (L), and proliferated smooth endoplasmic reticulum (SER) are showed. Free ribosomes (FR) are showed in the breakdown portion of RER (arrow).
C. Portion of hepatocytes from rat treated with ethanol. Several lipid droplet (L) are showed in the cytoplasm.
D. Portion of hepatocytes from rat treated with ethanol and CCl_4. Nucleus (N) occurred karyolysis in necrotic cell, and RER is complete breakdown. Multiple vacuolation (V) and condensed lipid droplets (L) are showed in the cytoplasm.

Table 3. Effect of dialysis on the hepatic and serum xanthine oxidase (XOD) activities in ethanol and CCl_4-treated rats

Treatment	Liver (nmoles uric acid/ mg protein/min)	Serum (μmoles uric acid/l/min)
Control	2.57± 0.13	26.48± 1.31
CCl_4	3.50± 0.19**[a]	43.86± 3.93**[a]
EtOH	3.22± 0.13**[a]	19.53± 1.86*[a]
EtOH+CCl_4	3.90± 0.17**[b]	43.18± 3.00***[b]

The assay procedure was described in the experimental methods and dialysis against sucrose (0.25 M) at 4℃ for 24 hrs.
Values are mean± S.E. of 6 rats.
[a]Significantly different from control.
[b]Significantly different from ethanol.
*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

% 정도의 유의한 증가를 나타내었다(Table 3).

5. Ethanol과 CCl_4 투여에 따른 catalase 및 GST 활성도 변동

Ethanol과 CCl_4 투여에 의한 간 mitochondria 분획의 catalase 활성은 대조군과 모든 실험군 사이에서 유의한 변동을 관찰할 수 없었다. 또한 cytosol 분획의 GST 활성변동은 ethanol 투여군이 대조군에 비해 약 17% 정도 증가하는 경향을 보였으나, CCl_4 투여군은 대조군에 비하여 약 23% 정도 유의한 감소를 보였고 ethanol 전처치군은 약 31% 정도의 현저한 감소를 나타냈으며 그 감소율은 ethanol 전처리군이 CCl_4만 투여한 군보다 높았다 (Table 4).

6. Ethanol과 CCl_4 투여에 따른 ADH의 활성 변동

Ethanol 투여군은 대조군에 비해 약 24% 정도 유의한 증가를 보였으나, CCl_4 투여군과 ethanol 전처리한 다음 CCl_4를 투여한 군에서는 대조군보다 모두 감소되는 경향을 나타냈다(Table 5).

Table 4. Effect of ethanol and CCl_4 treatment on the liver free radical scavenging system (mitochondrial catalase and cytosolic GST activities) in rats

Treatment	Catalase[1]	GST[2]
Control	185.85± 6.03	392.08± 16.00
CCl_4	178.26± 6.03	302.97± 9.46***[a]
EtOH	171.10± 2.58	460.02± 32.00
EtOH+CCl_4	180.41± 2.15	269.70± 13.80**[a],***[b]

The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean± S.E. of 6 rats.
[a]Significantly different from control.
[b]Significantly different from ethanol.
**p<0.01, ***p<0.001.
[1]nmoles H_2O_2 reduced/mg protein/min.
[2]nmoles #/mg protein/min.
: Conjugated glutathione, 2,4-dinitrobenzene.

Table 5. Effect of ethanol and CCl_4 treatment on the liver alcohol dehydrogenase (ADH) activities in rats

Treatment	ADH (nmoles NADH/mg protein/min)
Control	1.404± 0.048
CCl_4	1.359+ 0.112
EtOH	1.736± 0.136*
EtOH+CCl_4	1.253± 0.173

The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean± S.E. of 6 rats.
*Significantly different from control (p<0.05).

7. NADH가 간조직 XOD 활성에 미치는 영향

시험관내에 NADH의 첨가농도를 증가시켜 가면서 XOD 활성을 상대적으로 비교하였을 때 첨가농도가 증가함에 따라 효소의 활성이 반비례하여 감소됨을 관찰할 수 있었다.

8. Ethanol과 CCl_4 투여에 의한 혈청의 요산함량 및 간 uricase 활성 변동

CCl_4 투여군이 대조군에 비해 요산함량이 약 24% 정도 유의하게 증가되었고 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군은 대조군보다 36%의 현저한 증가를 보여, ethanol 전처리군이 CCl_4만 투여한 군보다 요산함량의 증가율이 높았다. 또한 ethanol 투여군은 대조군보다 요산함량이 증가하는 경향을 보였으나 타

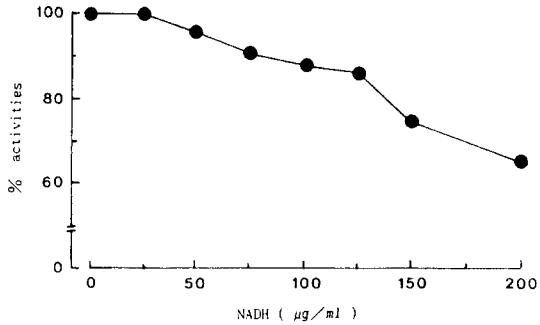

Fig. 3. Effect of NADH on the liver xanthine oxidase activities *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments.

Table 6. Effect of ethanol and CCl_4 treatment on the serum levels of uric acid and liver uricase activities in rats

Treatment	Uric acid (mg/dl)	Uricase[1]
Control	1.37± 0.08	13.26± 1.07
CCl_4	1.70± 0.11*[a]	13.84± 1.96
EtOH	1.64± 0.11	14.41± 2.14
EtOH+CCl_4	2.15± 0.12***[a],*[b],*[c]	17.87± 1.87

The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean± S.E. of 6 rats.
[a]Significantly different from control.
[b]Significantly different from CCl_4.
[c]Significantly different from ethanol.
*p<0.05, ***p<0.001.
[1]nmoles uric acid reduced/min/mg of protein.

군에 비해 그 증가율은 낮게 나타났다(Table 6).

한편 CCl_4 투여군 및 ethanol 투여군의 uricase 활성은 대조군에 비해 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군에서는 대조군에 비해 약 35% 정도 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다(Table 6).

IV. 고 찰

실험동물에 ethanol과 CCl_4를 병행하여 투여하였을 때 CCl_4만 투여한 경우보다 간손상이 더 심하게 나타남이 Traiger와 Plaa[29] 및 Strubelt[30]에 의해 보고된 바 있으나 그 기전에 대해서는 별다른 연구보고가 없다. 이에 본 연구에서는 ethanol을 전처리한 후 CCl_4를 급성으로 투여한 군에서 간손상의

정도가 심화된 것이 어떠한 기전에 의해 나타나는지를 검토코자 CCl_4만 투여한 군과 간손상의 정도를 상호 비교함과 동시에 이를 XOD의 활성변동과 비교검토코자 하였다.

본 실험에서 CCl_4 투여에 의한 간손상의 정도를 확인할 수 있는 parameter인 체중당 간무게와 혈청 ALT 증가율 및 간세포 각 분획 단백질과 간 glucose-6-phosphatase 활성[29] 감소율이 ethanol을 전처리한 다음 CCl_4를 투여한 군이 CCl_4만 투여한 군에 비해 높게 나타났으며, 또한 병리조직검사 소견에서도 ethanol 전처리군이 CCl_4만 투여한 군에 비해 간세포의 괴사정도가 심하게 나타났다.

이러한 결과는 Traiger와 Plaa[2]의 결과와 유사한 것으로 ethanol을 전처리함으로써 CCl_4만 투여한 군보다 간손상이 심하게 나타남을 알 수가 있다.

CCl_4에 의한 간조직 손상은 free radical 생성계 효소의 일종인 microsomal mixed function oxidase (MFO)에 의해 대사된 trichloromethyl radical에 의해 야기[13,14]되는 것으로 알려져 있으며, CCl_4의 독성은 MFO의 활성변동에 크게 영향을 받는 것으로 보고[30]되고 있다. 그러므로 ethanol을 전처리 한 후 CCl_4를 투여한 군에서 CCl_4만 주사한 군에 비해 간손상의 정도가 심화된 것이 ethanol 전처리에 의해 MFO의 활성에 변동이 야기하므로 나타난 것으로 생각되어지나, ethanol은 MFO의 활성에 별다른 영향을 미치지 않는다고 보고[31]되고 있어 ethanol의 전처리가 CCl_4의 독성을 증가시키는 것은 trichloromethyl radical의 생성계인 MFO의 활성변동으로 인한 영향은 아닐 것으로 사료되어진다.

한편 purine 염기의 대사과정에 관여[5]할 뿐만 아니라 oxygen free radical을 생성하여 조직손상을 야기시키는 것으로 알려져 있는 XOD는 ethanol 및 CCl_4 투여시 그 활성의 변동이 초래[2]되는 것으로 알려지고 있다. 그러므로 ethanol 전처리에 의한 CCl_4 독작용 증가현상이 free radical 생성계 효소의 일종인 XOD의 활성증가에 기인되어 나타나는지를 검토하였을 때, 모든 실험군에서 간조직 XOD의 활성은 대조군에 비해 유의하게 증가되었으며, 혈청에서도 ethanol 전처리군과 CCl_4 단독투여군 모두 그 활성이 유의하게 증가됨을 관찰할 수가 있었다.

이러한 실험성적으로 보아 CCl_4의 간독성에는 약물대사효소계 뿐만 아니라 XOD 효소기구의 활성변동과도 상당한 관련성이 있을 것으로 사료되어지며, 간 XOD 활성저해제를 전처리한 다음 CCl_4를 투여하였을 때 간조직 손상이 감소된다는 보고[9]를 종합해 볼 때, ethanol 전처리로 간 XOD의 활성변동이 초래되어 CCl_4의 독작용이 증가되어질 것으로 생각되어진다. 일반적으로 간조직 손상시 XOD이 활성증가 현상은 핵붕괴로 인한 핵산성물질의 다량 생성에 의해 기질성 유도작용으로 그 활성이 증가된다고 보고[32]되고 있다. 본 실험에서도 CCl_4만 투여한 군에 비해 ethanol을 전처리함으로써 핵붕괴가 현저히 증가됨을 전자현미경적 관찰로 확인할 수가 있으며, 또한 ethanol을 처리한 다음 CCl_4를 투여한 군에서 CCl_4만 투여한 군에 비해 uricase[24]의 활성이 높은데도 불구하고 XOD의 대사산물인 uric acid의 혈중농도가 높게 나타난 결과가 이를 뒷받침하는 것으로 XOD의 활성 증가현상이 간손상에 상당한 관련성이 있음을 암시하고 있다. 또한 이러한 결과는 trichlorometyl radical 뿐만 아니라 ethanol의 대사산물인 acetaldehyde도 간독성 물질[33]로 작용하기 때문에 간조직 세포의 핵붕괴와 괴사가 더욱 증가되며, 이 때 XOD의 활성도 증가되어 이로 인해 다량 생성된 oxygen free radical이 간손상을 더욱 심화시킨 것으로 사료되어진다. 그러나 CCl_4만 투여한 군에 비해 ethanol을 전처리한 다음 CCl_4를 투여한 군에서 간손상의 정도가 훨씬 더 심각하게 나타났음에도 불구하고 XOD 활성의 증가율이 유의하게 증가되지 않는 것은 ethanol의 전처리로 ethanol의 대사효소인 ADH의 활성이 증가된 점[19] 및 ethanol의 대사과정 중 NADH가 다량 생성되어 진다는 점[34]과, *in vitro*에서 NADH의 첨가량을 증가시켜 가면서 XOD의 활성을 측정하였을 때, NADH의 첨가량에 반비례하여 효소의 활성이 감소되어진 점, 그리고 CCl_4 투여시 ADH의 활성이 별다른 영향을 받지 않는다는 보고[31] 등을 종합해 볼 때 ethanol 전처리로 다량 생성된 NADH에 의해 XOD의 활성이 억제되었기 때문에 나타나는 현상으로 사료되어진다.

한편 해독과정에 관여하여 간손상을 방어하는 free radical해독계 효소[20,23]의 활성변동을 검토하였을 때 CCl_4만을 투여한 군과 ethanol 전처리 후 CCl_4를 투여한 군간에는 유의한 변동을 관찰할 수가 없었다.

이상의 모든 성적들과 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 ethanol을 전처리함으로써 이의 독성대사산물인 acetaldehyde가 다량 생성되어져 이것이 CCl_4의 대사산물인 trichloromethyl radical과 함께 협동적으로 작용해 간손상을 촉진시킴으로써 핵붕괴가 가속화되어져 핵산성물질의 산화효소이며, free radical 생성계 효소인 XOD의 활성이 기질유도성으로 증가되어 이것에 의한 다량의 핵산성물질 처리과정

중 과량으로 생성된 oxygen free radical이 acetaldehyde와 trichloromethyl radical과 함께 더욱 간손상을 심화시킨 것으로 사료되어진다.

V. 요 약

흰쥐에서 ethanol을 전처리한 후 사염화탄소(CCl_4)를 투여한 경우와 CCl_4만을 투여한 실험군 간에 간손상의 정도를 비교 관찰함과 동시에 CCl_4에 의한 간손상의 정도가 간 xanthine oxidase(XOD) 활성 변동과 어떠한 상관성이 있는지를 이들 성적과 상호비교하였다.

Ethanol 전처리 후 CCl4 투여군에 있어서 대조군에 대한 체중당 간무게, 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 활성도의 증가율과 간 glucose-6-phosphatase 활성도 및 간세포의 각 분획별 단백질 함량의 감소율이 CCl_4만을 투여한 실험군보다 높았으며, 병리조직검사에서도 ethanol이 전처리군이 CCl_4만을 투여한 군보다 간손상 정도가 더욱더 심하게 나타났다. 따라서 CCl_4에 의한 간손상이 ethanol을 전처리함으로써 그 심화현상이 크게 나타남을 확인할 수 있었다.

이러한 실험조건하에서 간 및 혈청 중 xanthine oxidase 활성은 CCl_4 투여군 및 ethanol 전처리한 후 CCl_4 투여군 모두 대조군보다 높게 나타났으며, 그 증가율은 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군에서 CCl_4 투여군보다 높게 나타났다. 그리고 ethanol 전처리 후 CCl_4 투여군이 CCl_4만을 투여한 군 보다 병리조직학적 소견에서도 간조직 세포의 괴사와 더불어 핵붕괴가 더욱 증가한 점 및 ethanol 전처리로 uricase 활성이 증가하였음에도 요산의 함량이 높게 나타난 결과 등으로 미루어 보아 ethanol의 전처리로 인하여 XOD의 활성이 증가되었을 뿐만 아니라 CCl_4 투여로 핵산성물질의 다량 붕괴에 따라 더욱더 활성증가율이 높게 나타날 것으로 생각된다. 한편 free radical 해독계 효소인 catalase, glutathione S-transferase 활성도는 ethanol 전처리군과 CCl_4 투여군 간에 유의한 변동이 없는 것으로 보아 ethanol 전처리가 free radical 해독계와는 무관한 것으로 사료된다.

이상의 성적들을 종합해 볼 때 CCl_4에 의한 간손상이 ethanol 전처리로 심화된 것은 ethanol 전처리로 간 XOD 활성이 증가되고 이로 인해 과잉으로 생성된 oxygen free radical에 의해 간조직의 손상이 더욱 심화된 것으로 사료되어진다.

참고문헌

1) 국세청 : 국세통계자료연보, 1970-1982.
2) Traiger, G. J. and Plaa, G. L. : Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CCl_4 hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **183**, 481-488, 1972.
3) Strubelt, O. : Interactions between ethanol and other hepatotoxic agent. *Biochem. Pharmacol., 29*, 1445-1449, 1980.
4) Ziegler, D. W., Hutchinson, H. D. and Kissling, R. E. : Induction of xanthine oxidase by virus infections in new born mice. *Infection and Immunity*, **3**(2), 237-242, 1971.
5) Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Corce, C. : Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Arzneim-Forsch. (Drug Res.)*, **26**(12), 2185-2186, 1976.
6) Crosby, P. F., Matos, M. L. and Rivera-Collazo, E. : Liver xanthine oxidase activity of mice infected with Schistosoma mansoni. *J. Parasit.*, **55**, 673, 1969.
7) Kang, H. Y. and Yoon, C. G. : Effect of the peritoneal injection of alcohol on hyperuricemia in rats previously fed low protein. *J. Korean Publ. Hlth. Asso.*, **12**(2), 81-88, 1986.
8) Al-Khalidi, U. A. S. and Geha, R. S. : The sensitivity of serum xanthine oxidase and serum glutamic pyruvic transaminase in detecting liver damage. *Clin. Chim. Acta.*, **14**, 833-835, 1966.
9) 유종국, 이상익, 신중규 : 식이성 단백질함량에 따른 흰쥐에 사염화탄소 투여가 Xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **20**(6), 527-537, 1991.
10) Matsubara, T., Mori, S., Touchi, A., Masuda, Y. and Takeuchi, Y. : Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: Evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. *J. Pharmacol.*, **33**, 435-445, 1983.
11) Drill, V. A. : Hepatotoxic agents: Mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**, 1-42, 1952.
12) Freeman, B. A. and Crapo, J. D. : Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412-426, 1982.
13) Simon, R. H., Scoggin, C. M. and Patterson, D. : Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7181-7186, 1981.
14) Rao, K. S. and Recknagel, R. O. : Early on set of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetra-

chloride administration. *Exp. Mol. Pathol.*, **9**, 271-278, 1946.

15) Rubin, E., Hutterer, F. and Popper, H. : Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride in toxication, a morphologic and chemical study. *Am. J. Path.*, **42**, 715-728, 1963.

16) Cohen, G., MacNamee, D. and Dembiec, D. : Elevation in blood acetaldehyde by pargyline during ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 313-316, 1974.

17) Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3863, 1969.

18) Yoon, C. G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal*, (Keimyung Junior College), **2**, 295-308, 1984.

19) Bergmeyer, H. U. : Methods of enzymatic analysis, 2nd edition: pp. 428-429, Academic Press Inc. (N. Y. and London), 1974.

20) Aebi, H. : Catalase in "Methods of Enzymatic Analysis", (Bergmeyer, H. U., eds.), Vol. 2, pp. 673-684, Academic Press. N. Y., 1974.

21) Hasushi, Y., Teschke, R. and Lieber, C. S. : Increased CCl_4 hepatotoxicity and its mechanism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, **66**, 415-422, 1974.

22) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400, 1925.

23) Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapture acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139, 1974.

24) Mahler, H. R. in Boyer, P. D., Lardy, H. A. and Myrbäck, K. : The Enzymes, Vol. 8, p. 285, Academic Press, N. Y., 1963.

25) Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58-63, 1957.

26) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.

27) Yonetani, Y., Ishii, M. and Iwaki, K. : Hyperuricemia induced by some antihypertensives and uricosuric drug in oxonate-treated rats. *Japan J. Pharmacol.*, **30**, 829-840, 1980.

28) Schefler, W. C. : Statistics for the Biological Sciences, ed. 2. U.S.A. Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company: pp. 84-89, 1980.

29) Hasushi, Y., Teschke, R. and Lieber, C. S. : Increased CCl_4 hepatotoxicity and its mechanism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, **66**, 415-422, 1974.

30) 윤종국, 강희양, 이상일 : 저단백식이로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여가 aniline hydroxylase 활성에 미치는 영향. 연구논집(계명대학교 기초과학연구소), **7**(1), 125-135, 1988.

31) Khanna, J. M., Kalant, H. and Lin, G. : Effect of CCl_4 treatment on ethanol metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 3269-3279, 1971.

32) 윤종국, 신중규 : 흰쥐에 사염화탄소투여가 혈액 및 뇨중 뇨산함량에 미치는 영향. 대한보건협회지, **15**(2), 13-19, 1989.

33) Weiner, H., Tank, A. W., von Wortburg, J. P. and Weber, S. : Interactions of aldehyde and protein. Abstr., Int. Symp. Alcohol. Aldehyde Metab. Syst., 3rd, p. 264, 1979.

34) Cherrick, G. R. and Leevy, C. M. : The effect of ethanol metabolism on levels of oxidized and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in liver, kidney and heart. *Biochim. Biophys. Acta.*, **109**, 29-37, 1965.