

## 만성 알콜 섭취로 인한 간내 알데히드 탈수소 효소 활성의 변동

문전옥\* · 양정화

부산대학교 약학대학

(Received April 22, 1996)

### Alteration of the Aldehyde Dehydrogenase Activity by the Chronic Ethanol Administration

Jeon-Ok Moon\* and Jeong-Hwa Yang

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

**Abstract**—The system most likely responsible for the accelerated metabolism of alcohol with chronic ingestion or at high blood ethanol levels, is the microsomal ethanol-oxidizing system(MEOS). While the increase in the MEOS with chronic ethanol ingestion is thought to be adaptive, it may also have serious adverse effects on the liver. The rates of the NADPH-dependent oxygen consumption by the liver microsomes from the prolonged ethanol fed rats were 2 times higher than the rates from the non-treated rats. With the alcohol ingestion, the total SH and nonprotein SH contents showed the significant decrease and at the same time, MDA in liver and GOT and GPT levels in blood showed the significant increase, which suggests the occurrence of liver damage due to the oxidative stress caused by chronic alcohol consumption. The mitochondrial aldehyde dehydrogenase(ALDH) activity was decreased by chronic ethanol ingestion, whereas the alcohol dehydrogenase activity and the cytosolic ALDH activity were not altered. These results suggest that the induction of cytochrome P450 by the chronic alcohol ingestion increases the oxidative stress which seems to result in the altered the physiological states of the liver including the ALDH activity, which may in turn to lead to the liver disease.

**Keywords** □ aldehyde dehydrogenase, alcoholic liver disease, microsomal ethanol oxidizing system (MEOS), active oxygen species, glutathione.

정상적인 상태에서 소량의 알콜을 섭취할 경우 간장 내로 들어온 에탄올은 cytosol 내의 알콜 탈수소 효소 (alcohol dehydrogenase, ADH)와 알데히드 탈수소 효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)의 작용에 의해 acetate로 되어 순환계를 통해 간세포 밖으로 배설된다.<sup>1)</sup> 건강한 성인의 최대 대사량은 하루에 160~180 g 인데 장기적으로 알콜을 섭취할 경우와 다량 음주 시에는 알콜성 간장해를 일으키게 된다. 현재 고려되고 있는 알콜성 간장해의 각종 발생 기전으로는 1) 간내 [NADH]/[NAD]비의 상승<sup>2)</sup>, 2) 에탄올의 주 대사산물인 아세트알데히드에 의한 간장해<sup>3, 4)</sup>, 3) 면역기구에

의한 간장해<sup>5)</sup>, 4) 과산화지질, 활성산소 및 free radicals에 의한 장해와<sup>6-8)</sup> 5) 중심정맥역(zone 3)의 hypoxia에 의한 간세포 장해 기전을 들 수 있다<sup>9, 10)</sup>.

이 중 특히 에탄올의 최종 대사산물인 아세트알데히드는 에탄올에 비해 월등히 반응성이 높고 독성이 강하여 알콜성 간장해의 주 원인 물질로 주목을 받고 있다.<sup>11)</sup> 아세트알데히드는 미토콘드리아 호흡을 장해하고 산화적 인산화 반응을 억제하며, 막단백질<sup>12)</sup> 및 콜라겐 단백질<sup>13)</sup>과도 결합하여 항체를 생성하고, 면역학적으로 세포독성을 나타내며<sup>14-16)</sup>, 간세포 분비 단백질의 방출 기구를 저해하는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 또한, 아세트알데히드는 myofibroblast의 콜라겐 합성을 촉진하여<sup>18)</sup> 간 섬유화의 촉진<sup>19)</sup>, 간세포의 변성·종대를 일으키며, 생체내 macromolecule과 반응하여 adduct를 형성하는<sup>17, 20, 21)</sup>

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 051-510-2808 (팩스) 051-513-6754

이외에도 각종 효소 활성 저해와<sup>5)</sup> GSH소비등을 통한 지질과산화물을 일으키는 등 다양한 간장해의 발생, 진전에 아세트알데히드가 관여할 가능성이 높은 것으로 보고 되고 있다.<sup>22-24)</sup>

간내에는 아세트알데히드 뿐만 아니라 각종 약물 및 지방대사산물과 과산화지질의 대사 과정, 그리고 C-C 결합의 산화적 절단으로 생체에 극히 유해한 것으로 알려진 여러가지 알데히드가 생성되는데, 아세트알데히드를 포함한 활성 알데히드의 산화에 관여하는 주 효소는 ALDH로서 간, 콩팥, 심장 및 위를 포함한 많은 장기와 조직에 널리 분포하며, cytosol, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에도 존재하여, 폭 넓은 기질 특이성을 보이고 각종 알데히드에 대응할 수 있는 약물대사효소의 성격을 지니고 있다.<sup>25)</sup> 따라서 어떤 요인에 의해 간내 ALDH활성에 변화가 오게 되면 간내 활성 알데히드의 해독 및 물질 대사에 중요한 영향을 미칠 것으로 추측된다.

본 연구에서는 만성 알콜 섭취로 인한 간장해 발생 기전의 해명의 일환으로 6주간 장기 알콜 투여한 웅성 흰쥐를 사용하여 만성 알콜 섭취로 인한 간내 세포하분획의 ALDH활성변동을 약물대사효소활성과 함께 검토하였다.

### 실험 방법

**장기 에탄올 섭취 및 간세포 하분획의 조제** - 실험동물로는 체중 약 170 g 전후의 Sprague-Dawley계의 수컷을 동양과학에서 구입하여 사용하였다. 실험기간 동안 사육실의 온도는  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$ 로 유지하였고 명암은 12시간으로 자동조절 시켰다. 군당 6 마리씩으로 하여 대조군과 알콜투여군으로 나누었고, 알콜투여군은 처음 1주간은 10% 에탄올, 다음 2주간은 15%, 마지막 3주간은 20% 에탄올을 자유로이 섭취케 하였다. 24시간 절식시킨 후 에틸로 마취한 흰쥐의 경동맥을 절단, 대부분의 피를 제거한 후 복부를 절개하여 냉냉한 1.19% KCl용액을 약 100 ml 관류시켜 간장내의 혈액을 제거하였다. 적출한 간중량의 약 3배 정도되는 0.1 M인산 완충액(pH 7.4)과 함께 균질화 하여 700×g에서 10분간 원심분리 하여 핵분획을 제거한 뒤, 9,000×g에서 20분간 원심분리 하여 미토콘드리아 분획을 얻었다. 상층액을 105,000×g에서 60분간 초원심분리 하여, 이때 얻은 상층액을 cytosol분획으로 하

고 pellet에는 인산 완충액을 가해 균질화하여 마이크로솜 분획으로 사용하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 법에 따라 행하였다.<sup>27)</sup>

**Cytochrome P450(P450)의 함량 측정** - Omura와 Sato의 방법<sup>28)</sup>에 준하여 환원형의 일산화탄소 차 스펙트럼에서 구했다. 즉 마이크로솜 분획을 20% glycerol을 포함하는 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)에 현탁시켜 0.7~2.0 mg protein/ml용액으로 만든 뒤 이 용액에 소량의  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 가해 환원시켰다. 이를 대조용과 sample용의 UV cell에 분주한 뒤 500~400 nm의 base-line을 보정했다. sample측에 일산화탄소 gas를 30초간 bubbling한 뒤 spectra를 기록하고 450 nm와 490 nm의 흡광도 차를 구해 분자흡광계수  $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 을 이용해서 계산하였다.

**간 마이크로솜의 Aminopyrine N-탈메틸화 활성** - Aminopyrine이 탈메틸화 되어 생성된 formaldehyde를 Nash법으로 측정하였다.<sup>29)</sup> 즉 100 mM 인산완충액(pH 7.4)에 10 mM의 aminopyrine과 간 마이크로솜 2mg prot. 및 glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase 1.25 unit를 포함하는 반응액을 37°C로 유지한 교반 항온조에서 3분간 preincubation시킨 뒤, G-6-P와  $\text{NADP}^+$ 를 각각 4 mM 및 0.4 mM이 되도록 가하여 반응을 개시했다(반응 총 용량 2.5 ml). 3분간 incubation 시킨 후 20% trichloroacetic acid 용액 1.0 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 이를 원심분리 시켜 얻은 상층액 2 ml를 분취하여 Nash시약을 가하여 37°C에서 40분간 발색시킨 뒤 412 nm에서의 흡광도를 측정, formaldehyde 검량선을 사용하여 정량하였다.

**간 마이크로솜의 aniline 수산화 활성** - 2.5 mM aniline, G-6-P 1.5 unit, 0.25 mM EDTA 및 마이크로솜 2 mg prot.을 포함하는 100 mM인산 완충액(pH 7.4)을 37°C에서 3 분간 preincubation한 뒤 G-6-P와  $\text{NADP}^+$ 를 각각 12.5 mM 및 1.25 mM이 되도록 가하여 반응을 개시했다(반응 총 용량 1.0 ml). 20분간 incubation 시킨 후 10% trichloroacetic acid 용액 1.0 ml를 가하여 반응을 종결하고 원심분리한 후 상층액을 취하여, 생성된 para수산화체인 p-aminophenol을 phenol-indophenol법<sup>30)</sup>으로 정량하였다. 즉 상층액 1.5 ml에 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5 ml, 2% phenol/0.2 N NaOH 1.0 ml를 가해 37°C에서 30분

간 발색시킨 뒤 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**산소 전극법에 의한 NADPH 의존성 산소 소비량 측정** - Clark형 산소전극(Rank brother Ltd.)를 사용하여 반응 cell내의 산소 농도 변화를 측정하였다. 5 mg의 시료 단백질을 포함하는 100 mM 인산 완충액 (pH 7.4) 2.3 ml을 37°C로 유지한 cell내에 주입하여 안정화 시킨다음 20%에탄올 100  $\mu$ l과 1.25  $\mu$ mol NADPH를 가했다(반응 총용량 2.5 ml). 37°C 완충액 중의 산소 농도를 220  $\mu$ M로<sup>31)</sup>, 반응후 포화  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  0.1 ml을 가했을 때의 산소 농도를 0  $\mu$ M로 하여 기록계에 나타난 산소 농도 곡선의 기울기로부터 1분간의 산소 소비량을 계산하였다.

**알콜 탈수소 효소 활성의 측정** - 1.0 mM의  $\text{NAD}^+$ , 5  $\mu$ M의 rotenone 및 단백질 시료 200  $\mu$ l을 포함하는 50 mM 인산 완충액(pH 7.4)을 cuvet에 넣어 37°C로 향은 유지한 UV spectrophotometer속에서 3분간 preincubation한 뒤, 에탄올 20  $\mu$ l을 가하여(반응 총용량 2.5 ml) 생성되는 NADH에 의한 340 nm의 흡광도 증가속도를 측정하여 분자흡광계수  $6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 ADH의 활성을 계산하였다. 효소활성은 unit/mg protein으로 나타내었다.<sup>32)</sup>

**알데히드 탈수소 효소 활성의 측정** - 1.0 mM의  $\text{NAD}^+$ , 0.1 mM의 pyrazole, 5  $\mu$ M의 rotenone, 2 mM의 2-mercaptoethanol 및 단백질 시료 200  $\mu$ l을 포함하는 50 mM 인산 완충액(pH 7.4)을 cuvet에 넣어 37°C로 향은 유지한 UV spectrophotometer속에서 3분간 preincubation한 뒤, propanal을 5 mM이 되게 가하여(반응 총용량 2.5 ml) 생성되는 NADH에 의한 340 nm의 흡광도 증가속도를 측정하여 분자흡광계수  $6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 ALDH의 활성을 계산하였다.<sup>33)</sup> 사용한 pyrazole은 alcohol dehydrogenase의 활성을 억제시키되 ALDH의 활성에는 영향을 미치지 않는 농도이며, rotenone은 미토콘드리아의 NADH oxidase활성을 억제하기 위하여 사용하였고 2-mercaptoethanol은 효소 보호제로서 첨가되었다. 효소활성은 unit/mg protein으로 나타내었다.

**GSH peroxidase(GPx) 활성 측정** - Tappel의 법에 준하여 0.01M  $\text{NaN}_3$  0.2 ml, 0.01 M GSH 0.2 ml, 1.5 mM NADPH 0.2 ml, GSSG-reductase (20U/ml) 0.1 ml 및 4mM EDTA함유 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 1.1 ml을 각각 취한 반응액에 효소원을 가하여 5분간 preincubation시킨후 5.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$

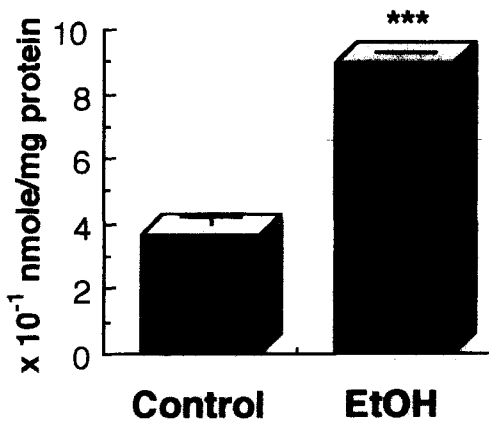
0.1 ml을 가하고(반응 총용량 2.0 ml) 340 nm에서의 NADPH 흡광도의 감소속도를 측정하여 분자흡광계수  $6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 GPx의 활성을 계산하였다. 효소활성은 unit/mg protein으로 나타내었다.<sup>34)</sup>

**GSH S-transferase(GST) 활성 측정** - Habig등의 법에 준하여 2.5 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 1 ml, 5 mM GSH 0.5 ml 및 0.25 M phosphate buffer (pH 6.5) 0.9 ml을 각각 취한 반응액을 25°C에서 5분간 미리 보온시킨 후 효소원을 가하여(반응 총용량 2.5 ml) 340 nm에서 흡광도의 변화를 관찰하여 측정하였다. 효소의 활성도는 conjugated CDNB의 증가속도를 측정하여 340 nm 에서 분자흡광계수  $9.6 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 GST의 활성을 계산하였다. 효소활성은 unit/mg protein으로 나타내었다.<sup>35)</sup>

**Total SH의 측정** - 간 균질액 50  $\mu$ l에 0.2M tris buffer (pH 8.2) 1 ml, 0.01M 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid 0.1 ml, 메탄올 4 ml을 가하고 24°C에서 15분간 방치한후 원심분리하여 그 상층액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 분자 흡광계수  $13 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 를 사용하여 그 양을 계산하였다.<sup>36)</sup>

**Nonprotein-SH의 측정** - 10% 간세포 균질액에 동량의 10% trichloroacetic acid용액을 가하여 원심분리한 상등액을 시료로 하였다. 시료 0.1 ml에 0.01M  $\text{NaNO}_2$  1 용적과 0.2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 용적을 혼합조제하여 0.5 ml을 가한 다음에 5분간 방치시켰다. 0.5% sulfamic acid ammonium 수용액 0.2 ml을 가하여 강하게 혼화한 후 1%  $\text{HgCl}_2$  1용적과 3.4% sulfanilamide/ 0.4N HCl 9 용적 혼액을 1 ml 가하였다. 그리고 0.1% N-1-naphthylethylenediamine (0.4N HCl 용액)을 1 ml 가하고 5분후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로서 125  $\mu$ M GSH용액을 사용하였다.<sup>37)</sup>

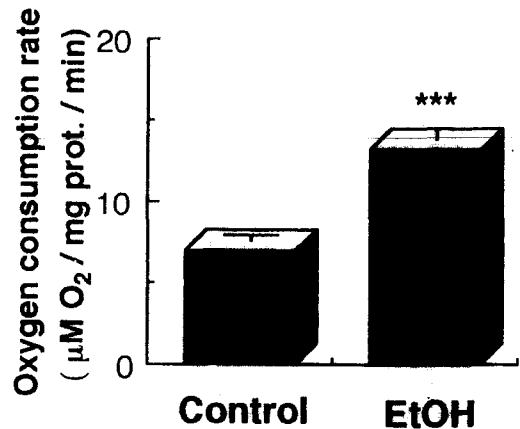
**Thiobarbituric acid 반응물질(TBARS)의 정량** - 단백질 시료 1 ml(5~6 mg protein 포함)에 정지액 3 ml을 가한 뒤 100°C에서 30분간 가열하고 냉각 후 원심분리한 상등액의 흡광도를 535 nm에서 측정하였다. 정지액으로는 416 mg의 thiobarbituric acid(TBA)와 16.8% trichloroacetic acid을 포함하는 0.125N HCl 100 ml에 6.8 mM butylated hydroxytoluene 에탄올용액 10 ml을 합하여 사용하였다. mg protein당 생성된 TBARS의 양은 millimole 흡광계수 156을 사용하여 계산하였다.<sup>35)</sup>



**Fig. 1**—The contents of cytochrome P450 of the live microsomes from the control and the ethanol-treated rats.

Bar represent the means±S.E. of six rats

\*\*\*Significantly different(p<0.001) from control.



**Fig. 2**—The NADPH-dependent oxygen consumptions by liver microsomes from the control and the ethanol-treated rats.

The reaction mixtures with the final volume of 2.5 ml, contained 100 mM of sodium phosphate at pH of 7.4, 5 mg of microsomal proteins, 100 μl of 20% ethanol and 1.25 μmol NADPH. Bars represent the means±S.E. of six rats

\*\*\*Significantly different(p<0.001) from control.

**Table I**—The N-demethylation of aminopyrine and the hydroxylation of aniline activities of liver microsomes of rats

Treatment	Cytochrome P-450 activity (nmole/mg prot.)	
	aminopyrine	aniline
Control	11.5±1.0(100)	0.538±0.040(100)
Ethanol	30.5±2.3(264)***	1.85±0.08(344)***

The reaction mixtures for the demethylation of aminopyrine with the final volume of 2.5 ml contained 100 mM of sodium phosphate (pH 7.4), 2 mg of microsomal proteins, NADPH-generating system (1.25 unit of G-6-P dehydrogenase, 4 mM G-6-P, and 0.4 mM NADP<sup>+</sup>), and 10 mM of aminopyrine. The figures represent nmole HCHO formed per mg of proteins per minutes. The reaction mixtures for the hydroxylation of aniline with the final volume of 1.0 ml contained 100 mM of sodium phosphate (pH 7.4), 2 mg of microsomal proteins, NADPH generating system, 0.25 mM of EDTA and 2.5 mM of aniline. The figures represent nM of p-aminophenol formed per mg of proteins per minutes. Reaction mixtures are incubated for 3 min (for aniline, 20 min). \*\*\*Significantly different(p<0.001) from control. Data points are the mean±S.E. of six rats.

**GOT, GPT의 측정** - 이 실험은 Reitman-Frankel법<sup>37)</sup>을 적용한 Kit제품(Eiken Chemical Co., LTD.)을 사용하여 시행하였다.

## 결 과

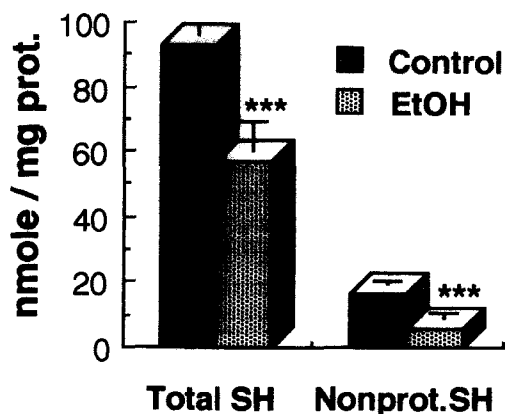
### 알콜 장기 섭취로 인한 간내 약물대사효소계의 변동

약 170 g 전후의 Sprague-Dawley 계 웅성 흰쥐에 10~20%의 알콜수를 자유로이 마시게 했을 때의 6주 후의 체중은 약 260 g으로서 대조 group과 별다른 차이가 없었다. 이들의 간 마이크로솜 분획의 P450의 함량을 측정된 결과 알콜 섭취군은 mg protein당 0.89±0.01 nmole로 대조군의 0.40±0.02 nmole에 비해 약 2.2배의 증가를 보였다(Fig.1).

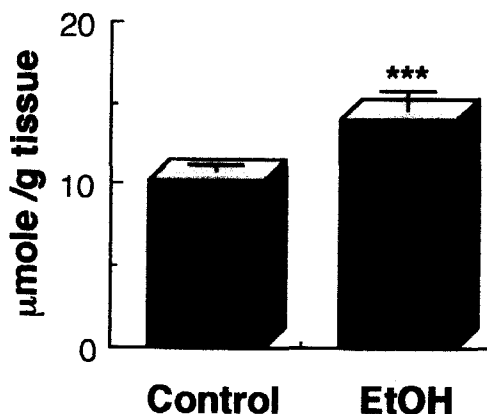
Table 1에 aminopyrine 및 aniline 을 기질로 한 약물 대사 효소 활성을 검토한 결과를 나타내었다. 알콜 투여군의 aminopyrine의 탈메틸화 활성은 30.47±2.28(nmole/mgprot.)로 대조군의 11.54±1.01에 비해 2.6배 상승되어 있었고 aniline의 수산화 활성은 알콜 투여로 인해 0.54±0.04(nmole/mg prot.)에서 1.85±0.08로 약 3.4배 증가됨을 보였다.

### NADPH 의존성 산소소비

대조 흰쥐의 간 마이크로솜 분획과 장기 알콜 섭취시킨 흰쥐의 간 마이크로솜 분획이 들어있는 반응 cell내에 NADPH 용액을 가했을 때의 산소소비속도를 검토하였다(Fig.2). 알콜 투여 흰쥐의 마이크로솜 분획에 의한 NADPH의존성 산소소비속도는 13.29±0.55로 대조군의 6.88±0.32 μM/min/mg prot.에 비해 약 2배 가량의 증가를 보였고 이는 P450 함량 증가 결과와



**Fig. 3**—The contents of total SH and non-protein SH in the liver homogenate. Bars represent the means±S.E. of six rats \*\*\*Significantly different(p<0.001) from control.

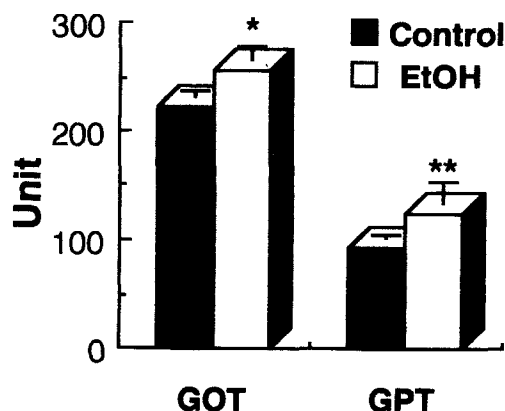


**Fig. 4**—Effects of ethanol on the formation of the thiobarbituric acid reactive substances in the liver. Bars represent the means±S.E. of six rats \*\*\*Significantly different(p<0.001) from control.

**Table II**—The reactivities of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in the liver cytosol

Treatment	Enzyme Activity(×10 <sup>-2</sup> unit/mg prot)	
	Glutathione peroxidase <sup>1)</sup>	Glutathione S-transferase <sup>2)</sup>
Control	9.59±1.52	33.71±8.94
Ethanol	12.01±2.19	52.17±6.48

<sup>1)</sup>The reaction mixture contained 0.1M of phosphate buffer (pH 7.0), 4 mM EDTA, 1.0 mM NaN<sub>3</sub>, 1.0 mM GSH, 0.15 mM NADPH and 2 unit of GSSG-reductase in a final volume of 2.0 ml. <sup>2)</sup>The reaction mixture contained 0.25M of phosphate buffer (pH 6.5), 1.0 mM of CDNB and 2.0 mM of GSH in a final volume of 2.5 ml. \*\*Significantly different(p<0.01) from control. Data points are the mean±S.E. of six rats.



**Fig. 5**—Effects of the chronic ethanol administration on the GOT and GPT levels in the blood of rats. Bars represent the means±S.E. of six rats Significantly different from control(\* p<0.05, \*\*p<0.01).

일치했다.

**알콜 섭취로 인한 항산화계의 변화**

알콜섭취로 인한 항산화계의 변동을 검토하기 위해 Total SH, nonprotein SH 및 GPx 활성을 검토하였다. 간 혼합균질액 속의 Total SH 함량은 대조군의 92.94±3.37 nmole/mg prot.에 비해 알콜 섭취로 약 61% 수준으로 감소된 56.80±8.73 nmole/mg prot.이었고(p<0.001), nonprotein SH 함량은 대조군이 16.49±0.54 nmole/mg prot., 알콜 투여군이 6.06±1.39으로 알콜 투여로 인해 현저히 감소하여 대조군의 36%수준에 머물렀다(p<0.001)(Fig. 3). cytosol의 GPx 활성을 측정된 결과 알콜 투여군은 1.2×10<sup>-1</sup>unit/mg prot.으로 대조군의 9.5×10<sup>-2</sup>unit/mg prot.에 비해 높았

나 통계학적 유의성은 없었다.(P>0.05) 한편, cytosol의 GSH S-transferase 활성은 대조군의 3.37×10<sup>-1</sup> unit/mg prot.에 비해 알콜섭취로 약 150% 증가한 5.21×10<sup>-1</sup> unit/mg prot.였다(p<0.01)(Table II).

**알콜 섭취로 인한 간상해 측정**

간 혼합균질액 속의 과산화 지질 생성량, 혈청중의 GOT 및 GPT 활성을 검토하였다. 알콜 섭취군의 경우 g liver 당 MDA의 양이 14.00±1.08 μmole로 대조군의 10.28±0.22에 비해 유의성 있게 높았으며(p<0.001)(Fig. 4). 혈청중의 GOT, GPT 활성도 알콜 섭취로 인해 255.03±13.71 및 124.45±19.89 Unit로 대

**Table III**—Effect of ethanol on the alcohol dehydrogenase activity in the rat liver

	Enzyme activity ( $\times 10^{-3}$ unit/mg protein)	
	control	Ethanol
ADH	2.45 $\pm$ 0.01	2.48 $\pm$ 0.02

The reaction mixtures contained, in final volume of 2.5 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4), 1~2 mg of protein sample, 20  $\mu$ l of ethanol, 1.0 mM of NAD<sup>+</sup>, 5  $\mu$ M of rotenone(in methanol 20  $\mu$ l). The reaction mixtures except ethanol were preincubated for 3 min at 37°C, the reaction was started by the addition of ethanol.

**Table IV**—Effect of ethanol on the aldehyde dehydrogenase activity in the rat liver

Treatment	ALDH activity ( $\times 10^{-2}$ unit/mg protein)		
	cytosol	mitochondria	microsome
Control	0.652 $\pm$ 0.045	3.71 $\pm$ 0.53	0.893 $\pm$ 0.134
Ethanol	0.688 $\pm$ 0.042	2.10 $\pm$ 0.12***	2.02 $\pm$ 0.248***

The reaction mixtures contained, in final volume of 2.5 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4), 1~2 mg of protein sample, 5 mM of propion aldehyde, 1.0 mM of NAD<sup>+</sup>, 0.1 mM of pyrazole, 2 mM of mercaptoethanol, and 5  $\mu$ M of rotenone (in 20  $\mu$ l of methanol). The reaction mixtures except propion aldehyde were preincubated for 3 min \*\*\*Significantly different(p<0.001) from control. Data points are the mean $\pm$ S.E. of six rats.

존군의 220.83 $\pm$ 5.22 및 93.46 $\pm$ 1.68 Unit에 비해 각각 유의성 있는 증가를 보였다(각각 p<0.05, p<0.01) (Fig. 5).

### 알콜 탈수소 효소 활성의 변동

cytosol의 ADH 활성을 검토한 결과를 Table III에 나타내었다. 대조군의 활성은 mg prot.당 2.45 $\times 10^{-3}$  unit였는데 장기 알콜 섭취로 2.48 $\times 10^{-3}$  unit로 거의 같아 ADH 활성은 알콜 섭취에 영향을 받지 않음을 보였다.

### 알데히드 탈수소 효소 활성의 변동

Table IV는 알콜 섭취로 인한 간내 ALDH 활성 변동을 간 분획별로 검토한 결과이다. 알콜 섭취시 cytosol의 ALDH 활성은 6.88( $\pm$ 0.42) $\times 10^{-3}$  unit/mg prot.으로 대조군의 6.52( $\pm$ 0.45) $\times 10^{-3}$  unit/mg prot.와 거의 변동이 없었다. 알콜 투여시의 미토콘드리아 분획의 ALDH활성은 대조군의 37.1( $\pm$ 5.30) $\times 10^{-3}$  unit/mg prot.의 약 57%에 해당하는 21.0( $\pm$ 1.2) $\times 10^{-3}$  unit/

mg prot.으로 알콜 섭취로 미토콘드리아 분획의 ALDH활성이 유의성 있게 감소됨을 알 수 있었다(p<0.001). 한편, 마이크로솜 분획의 ALDH활성은 알콜 섭취군이 20.2( $\pm$ 2.5) $\times 10^{-3}$  unit/mg prot.으로 대조군의 8.9( $\pm$ 1.3) $\times 10^{-3}$  unit/mg prot.에 비해 2배가량 증가되어 알콜 섭취로 인해 간 마이크로솜의 ALDH 활성이 유도되어 있음을 관찰 할 수 있었다.

## 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 쉬운데<sup>40)</sup> 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.<sup>11)</sup>

정상적인 상태에서나 저농도의 알콜 존재하에서 알콜은 주로 ADH에 의해 산화되어 NADH와 acetaldehyde를 생성하며 약 10%의 알콜은 분자상 산소와 NADPH 존재하 미소체 에탄을 산화계(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)를 통해 산화되어 acetaldehyde, NADP<sup>+</sup> 및 H<sub>2</sub>O를 생성한다.<sup>1, 11)</sup>

한편, 만성 에탄을 투여시에 (i) 에탄을 대사는 촉진되지만 ADH활성 변화는 일어나지 않고<sup>2)</sup>, (ii) smooth endoplasmic reticulum(SER)의 증식이 일어나며<sup>41)</sup>, (iii) P450 함량 증가와 함께 MEOS의 활성 증가 현상이 나타난다.<sup>26, 28)</sup> 또, (iv) ADH결핍 deermice의 ethanol 대사 속도가 정상 deermice의 80%에 달하며<sup>42)</sup> 이 동물에 알콜을 장기투여 했을 때 에탄을 대사가율이 증가하며 그 활성은 MEOS활성 증가에 의한 것이란 연구 결과가 보고되고 있다.<sup>43, 44)</sup> 이러한 사실들은 만성 에탄을 섭취후의 에탄을 대사를 증가가 주로 MEOS활성 증가에 기인함을 보여주는 것으로서, MEOS활성 유도는 지속적인 alcohol섭취에 대한 적응과정에서 일어난 현상으로 간주된다.

그러나 만성알콜 섭취로 인한 간 마이크로솜의 항시적인 증식은 간에 심한 부작용을 낳을 수 있다. 산소 활성화를 통하여 생체 방어를 목적으로 기능하는 P450은 NADPH-cytochrome P450 reductase를 통해 전자가 공급되며, 산소 존재하 환원형의 P450은 즉시 산소

와 결합하여 산소화형이 되며 산소화형 중간체는 기질이 없을 경우 superoxide anion을 방출하고 산화형의 P450을 재생한다.<sup>45)</sup> 기질이 존재할 경우 산소화형에 두 번째 전자가 도입된 뒤 일원자산소가 기질로 도입되고 나머지 산소원자는 물이 되어 기질 산화반응은 종결되고 산화형의 P450이 재생된다. 이 반응속도와 산화형의 분해속도와의 비는 비록 기질에 따른 차이가 있지만 대략 1:1 정도로 보고되고 있는데 기질 존재하 cycle의 회전속도가 더 커지므로 실제 산소화형 P450의 autooxidation에 의한 활성산소 생성량은 기질 대사중에 더 많아지게 된다. 이 사실은 만성 알콜섭취로 일어나는 간 마이크로솜 증식 결과 P450의 autooxidation에 의한 활성산소 생성량이 증가할 뿐만 아니라<sup>46)</sup> 에탄올이 MEOS계에 의해 산화될 때는 superoxide 및 hydrogen peroxide의 생성량이 더욱 더 증대함을 시사한다.

본 연구 결과 6주간 10~20% 에탄올을 섭취시킨 흰쥐의 간 마이크로솜 분획에 의한 NADPH 의존형 산소 소비속도는 대조군의 2배가량 높았고(Fig 2), 이는 P450 함량 증가 결과와 일치했다(Fig 1). 이와 같이 간내 P450의 유도로 간내 산소 소비가 활발해질 경우 간세포가 지속적인 hypoxia 상태로 될 가능성이 있는데 이는 만성 알콜 섭취시의 간세포괴사가 특히 간 마이크로솜 증식이 두드러지는 중심소엽부위에서 일어난다는 사실과도 일치한다. 간 마이크로솜 증식으로 산소 요구량이 많아져서 간세포의 특정 구역이 저산소 상태로 놓이게 될때 xanthine dehydrogenase는 xanthine oxidase로 변하게 된다.<sup>47)</sup> 알콜 대사 산물인 아세트알데히드가 다량 존재할때 xanthine oxidase는 이를 기질로 하여 활성산소를 더욱 더 발생시키고<sup>48)</sup> 이는 MEOS계를 통해 생성된 활성산소와 아울러 간내를 더욱 oxidative stress에 놓이게 할 가능성이 있다.

생리적인 조건하에서 소비된 산소의 3~10%는 활성산소종으로 변하고 대부분의 활성산소는 다양한 분자와 재빨리 반응하여 세포기능에 영향을 미치고 있다. 이러한 활성산소 방어기구에는 vitamine E, ascorbic acid, selenium과 GSH를 포함하는 비효소적기구와 세포내 superoxide dismutase, catalase 및 GSH peroxidase를 포함하는 효소적 방어기구가 있는데 본 실험에서 간 혼합균질액속의 total SH 및 non-protein SH함량을 비교하였을 때 알콜 섭취로 인해 total SH 함량은 대조군의 61% 수준에 머물렀고

nonprotein SH함량은 대조군의 36% 수준에 지나지 않았다(Fig. 3). Nonprotein SH의 약 95%에 해당하는 GSH는 생물계 전반에 걸쳐 고농도로 분포하여 극히 중요한 역할을 하고 있는데, 특히 해독에 중요한 간장에서 해독 대사 및 산화 환원 상태의 조절에 중요한 역할을 하고 있다. GSH의 생성속도에 비해 소비속도가 클 경우 세포내의 GSH농도가 감소하는데 Speisky와 Lauterberg는 아세트알데히드가 GSH의 합성을 저해하므로 간세포내 GSH의 농도가 저하한다고 보고하고 있고<sup>49, 50)</sup> Lieber는 아세트알데히드가 반응성이 높아 GSH와 직접 반응, 소비할 가능성을 보고하고 있다.<sup>21)</sup> 한편, French는 만성 알콜 투여로 간내 GSH의 변화가 없다고 하며<sup>51)</sup>, Videla와 Villena는 간내 GSH level의 감소를 보고하는 등<sup>52)</sup> 만성 알콜 투여한 흰쥐의 간내 GSH 함량의 변동에 대해서는 이견이 엇갈리고 있지만 대체로 영장류에서는 만성 알콜 섭취시 간내 GSH 함량이 저하한다는 사실에 일치를 보고 있다.

활성산소 생성량의 증가와 GSH를 비롯한 활성산소로부터의 방어체계에 불균형이 발생할 때 세포는 활성산소의 피해를 입게 된다. 대표적인 활성 산소종의 피해인 지질과산화는 간질환 동물모델이나 사람의 알콜 중독에서 일어난다는 보고가 있지만 지질과산화와 간상해와의 관련성이 늘 관찰되는 것은 아니고 일부 연구에서는 만성 에탄올 섭취로 지질과산화가 일어남을 증명하지 못하고 있으며, 특히 알콜성 간질환에서의 지질과산화의 역할에 대해서는 다른 견해가 많다.<sup>53)</sup> 그러나 Svingen등은 NADPH-cytochrome P450 reductase를 통하여 NADPH에 의해 환원된 chelate-철과 산소의 복합체가 지질과산화를 일으킨다고 보고하였고<sup>54)</sup> Ekstrom과 Ingelman-Sunderberg는 NADPH, NADPH-cytochrome P450 reductase, P450 및 마이크로솜 막에서 추출한 지질로 된 재구성계에서 chelate-철이 없어도 P450에 의존하는 지질과산화가 일어난다고 보고하면서 P450이 지질과산화의 개시반응에 관여할 가능성을 시사하고 있다.<sup>55)</sup> 본 실험에서는 6주간의 알콜 섭취로 인해 간에서의 지질과산화 생성량이 증가해 있음을 알수 있었다(Fig. 4). 또 혈중 GOT 및 GPT활성이 대조군에 비해 상승되어 있음을 볼때(Fig. 5), 본 실험계에서는 장기 알콜 섭취로 인한 간상해가 일어났음을 추측할 수 있었다.

이 때 알콜을 대사하는 ADH활성을 검토한 결과

ADH활성은 장기 에탄올 섭취로 인한 변동이 거의 없음을 알 수 있었다(Table III). 이에 반해서 ALDH활성은 장기 에탄올 섭취로 인해 분획별로 서로 다른 활성 변동을 나타내었다(Table IV). 즉, cytosol분획의 활성은 대조군과 같았으나 미토콘드리아 분획의 활성은 알콜 장기 섭취로 인해 대조군의 57%정도의 낮은 활성을 보였다. 한편 간 마이크로솜 분획의 ALDH활성은 알콜 섭취로 인해 대조군의 약 2배 가량 높았다. 이는 마이크로솜 분획의 약물대사 활성이 aminopyrine 및 aniline을 기질로 하였을 때 약 2.6~3.4배 증가 하였고 제 2상 약물대사효소인 GST활성이 만성 알콜 섭취로 인해 유도된 사실을 고려할 때 간 마이크로솜 분획의 ALDH활성도 알콜 섭취로 인해 일단 유도되었을 가능성을 보여주고 있다.

간내에는 아세트알데히드 뿐만아니라 각종 약물 및 지방 대사 산물과 과산화지질의 대사 과정, 그리고 C-C 결합의 산화적 절단으로 여러가지 알데히드가 생성되는데 특히 각종 원인에 의해 생성된 과산화지질 대사 과정에서 유리된 지방족 알데히드는 높은 화학적 반응성으로 인해 GSH의 고갈, 지질과산화의 개시, 단백질 합성 및 활성저해를 포함하여, 단백질의 아미노산등에 용이하게 결합하는 등의 각종 기전으로 세포독성을 나타내므로 생체에 극히 유해한 물질로 알려져 있다.<sup>56)</sup> 이들 지방족 및 방향족 알데히드를 비가역적으로 산화시키는 ALDH는 폭 넓은 기질 특이성을 보이고 각종 알데히드에 대응할 수 있는 약물대사효소의 성격을 지니고 있으므로 cyclophosphamide 및 mafosphamide와 같은 항암제의 대사에도 관여한다.<sup>57)</sup> 따라서 알콜 만성 섭취 및 약물의 섭취 등 생체가 놓여 있는 상황에 따라 ALDH 활성의 변화가 생긴다면 이는 알콜 대사 뿐만아니라 간내 해독 및 물질 대사에 큰 변화를 초래할 것이 예상된다.

본 연구진은 ALDH가 활성 산소종에 대한 감수성이 크고 활성 산소종에 의한 ALDH의 불활성화가 Catalase 및 GSH에 의해 보호되는 사실을 보고한 적이 있다.<sup>58, 59)</sup> 본 실험에서도 만성 알콜 섭취로 간내 P450의 유도가 일어나 활성 산소종의 생성이 많아짐과 함께 간내 GSH함량이 감소되었음을 관찰하였는데 이로 인해 특히 미토콘드리아의 ALDH 활성이 저하되었을 가능성이 있는 것으로 사료된다. 분획별 ALDH활성의 변동이 알콜성 간 상해에 어떤 직접적인 관련이 있는지는 위 실험 결과로 알수 없지만 장기 알콜 섭취에 따

른 간내 ALDH 활성 변동에 대한 보다 상세한 검토는 고농도로 축적된 아세트알데히드의 해독 및 생체 내의 활성 알데히드에 의한 2차적 간장해 발생기전의 해명에 유익한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

## 결 론

SD계 음성 흰쥐에 6주간 에탄올을 섭취시켰을때 간 마이크로솜 분획의 P450유도가 일어나 aminopyrine 및 aniline을 기질로 한 약물 대사 활성이 2배이상 증가 하였으며 제 2상 약물대사효소인 GST활성도 유도되었다. 이때 NADPH 의존성 산소 소비 속도는 알콜 섭취군이 2배로 높아 지속적인 알콜 섭취에 대한 적응과정에서 일어난 MEOS 활성 유도로 간세포 내의 oxidative stress를 가하고 있음을 보여주었고 이는 간 Total SH, non-protein SH의 감소, MDA생성량의 증가와도 일관성을 보였다.

혈중 GOT및 GPT level의 상승으로 간 상해가 일어났음을 추측할 수 있는데, 이때의 ADH 및 ALDH 활성을 검토한 결과 ADH활성은 거의 변화가 없는데 반하여 ALDH 활성에 미치는 알콜의 영향은 분획별로 달라서 cytosol 분획의 활성은 대조군과 같았으나 미토콘드리아 분획의 활성은 대조군의 57% 정도에 해당하는 낮은 활성을 보였고, 마이크로솜 분획의 활성은 제 1상 및 제 2상 약물대사 효소인 P450과 GST가 유도된 것과 같이 ALDH 활성도 유도되어 있음을 관찰했다.

분획별 ALDH활성의 변동이 알콜성 간 상해에 어떤 직접적인 관련이 있는지는 위 실험 결과로 알수 없지만 장기 알콜 섭취에 따른 간내 ALDH 활성 변동에 대한 검토는 고농도로 축적된 아세트알데히드의 해독 및 생체 내의 활성 알데히드에 의한 2차적 간장해 발생기전의 해명에 유익한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Lieber, C. S. : Alcohol and the liver, 1984 update, *Hepatology* 4, 1243 (1984).



- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) Von Burg, R. and Stout T. : Toxicology update: Acetaldehyde *J. Appl. Toxicol.* **11**, 373 (1991).
- 5) Kennedy, N. P. and Tipton, K. F. : Ethanol metabolism and alcoholic liver disease *Essays in Biochemistry* **25**, 137 (1990).
- 6) 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).
- 7) Shaw, S. : Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 541 (1989).
- 8) 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).
- 9) Tsukamoto, H., Cavallaro, G., Peppin, J. F. and Towner, S. J. : Blood ethanol level correlates with liver pathology and gradient of oxygen tension from portal to hepatic vein. *Hepatology* **6**, 1189 (1986).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Lumeng L., Minter R. and Li, T. K. : Distribution of stable acetaldehyde adducts in blood under physiological conditions. *Fedn. Proc.* **41**, 765 (1982).
- 13) 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).
- 14) Zetterman, R. K. : *Autoimmune manifestation of alcoholic liver diseases*, ed. Kravitt, K. I. and Wiesner, R. H. Raven Press, New York, p.247 (1991).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) Pawlica, E., Bankowski, E. and Sobolewski K. : Chronic intoxication with acetaldehyde stimulates collagen biosynthesis in rat liver. *Arch. Toxicol.* **65**, 678 (1991).
- 19) Friedman, S. L. : Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis: Fuel to the fire, but not the spark. *Hepatology* **12**, 609 (1990).
- 20) Barry, R. E. : Alcohol-mediated liver damage. *G. I. Futures Clin. Practice.* **4**, 4 (1989).
- 21) Lieber, C. S. : Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 241 (1988).
- 22) 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).
- 23) Jennett, R. B., Sorell, M. F., Saffari-Fard, A., Ocker, J. L. and Tuma, D. J. : Preferential covalent binding of acetaldehyde to the  $\alpha$ -chain

- of purified rat liver tibulin. *Hepatology* **9**, 57 (1989).
- 24) Palmer, K. R. and Jenkins, W. J. : Aldehyde dehydrogenase in alcoholic subjects *Hepatology* **5**, 260 (1985).
- 25) Tipton, K. F., Henehan, G. T. M. and Harrington, M. C. : Cellular and intracellular distribution of aldehyde dehydrogenases. In *Human metabolism of alcohol*, Vol. 2 (Crow, K. e and Batt, R. D., eds) pp. 105-116 CRC Press Boca Raton (1989).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) Sato, R. and Omura, T. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379 (1964).
- 29) Nash, T., *Biochem. J.*, **55**, 416 (1953).
- 30) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R., *J. Biochem.*, **60**, 417 (1966).
- 31) 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).
- 32) Crow, K. E., Cornell, N. W., and Veech, R. L. (1977) : *Alcohol and Aldehyde metabolizing System.*, Vol. III. p335. Thurman, R. G., Williamson, J. R., Drott, H. R. and Chance, B. ed., Academic Press.
- 33) Tottman, S. O. C., Petterson, H., and Kiessling, K. H., *Biochem. J.*, **135**, 577 (1973).
- 34) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab., Clin., Med.*, **70**, 158 (1967).
- 35) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jabby, W. B. : Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biochem.*, 249 (1974).
- 36) Sedlak, J., and Lindsay, R. H. : Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. ochem.* **25**, 192 (1968).
- 37) Higash, T. : Critical review on the determination of glutathione in biological preparations. *Proteins, Nucleic Acid and Enzyme*, **33**, 1370 (1988).
- 38) Jukkola, A. and Niemela, O. : Covalent binding of acetaldehyde to type III collagen. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **159**, 361 (1989).
- 39) Retiman, S. and Frankel, S. : Estimation of glutamate oxaloacetate transaminase in the serum of liver disease patients. *Am. J. Clin. Path.* **28**, 56 (1957).
- 40) Lieber, C. S. : Alcohol, protein metabolism and liver injury, *Gastroenterology* **79**, 373 (1980).
- 41) 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).
- 42) 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).
- 43) Handler, J. A., Koop, D. R., Coon, M. J., Takei, Y. and Thurman, R. G. : Identification of P-450<sub>ALC</sub> in microsomes from alcohol dehydrogenase-deficient deermice: Contribution to Ethanol Elimination in Vivo, *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 114 (1988).
- 44) 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).
- 45) Sligar, S. G., Lipscomb, J. D., Debrunner, P. G. and Gunsalus, I. C. : Superoxide anion production by the autooxidation of cytochrome P-450<sub>cam</sub>, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 290 (1974).
- 46) Shaw, S. : Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* **7**, 541 (1989).
- 47) Sato, N. and Hijioka, T. : Mechanism of al-

- coholic liver injury, in *Metabolism and Disease* 26, 1087 (1989).
- 48) Fridovich, I. : Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radical Biology & Medicine* 7, 557 (1989).
- 49) 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).
- 50) Koskinas, J., Kenna, J. G., Bird, G. L., Alexander, G. J. M. and Williams, R. : Immunoglobulin antibody to a 200 kilodalton cytosolic acetaldehyde adduct in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 103, 1860 (1992).
- 51) Tsukamoto H, Gaaal K, French SW. : Insights into the pathogenesis of alcohol liver necrosis and fibrosis. *Hepatology* 12, 599 (1990).
- 52) Videla LA, Villena MI. : Effect of ethanol, acetaldehyde and acetate on the antioxidant-sensitive respiration in perfused rat liver. *Alcohol*, 3, 163 (1986).
- 53) I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakob, D. A. Schachter, and D. A. Shafritz. *The Liver : Biology and Pathobiology*, 3rd edition. p1383 Raven Press, Ltd., New York (1994).
- 54) 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).
- 55) Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M. : Mechanism of lipid peroxidation dependent upon cytochrome P-450<sub>LM2</sub>. *Eur. J. Biochem.* 158, 195 (1986).
- 56) Esterbauer, H., Zollner, H. and Lang, J. : Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochem. J.* 228, 363 (1985).
- 57) Maki, P. A. and Sladek, N. E. : Sensitivity of aldehyde dehydrogenases in murine tumor and hematopoietic progenitor cells to inhibition by chloral hydrate as determined by the ability of chloral hydrate to potentiate the cytotoxic action of mafosfamide. *Biochem. Pharmacol.* 45, 231 (1993).
- 58) Moon, J. -O. : Cytochrome P-450-induced lipid peroxidation and oxygen consumption of the liver. *Pusan Bull. Pharm. Sci.* 27, 38 (1993).
- 59) Moon, J-O., Kim, T-W., Paik, K-J. and Kim, K-H. : Inhibition of aldehyde dyhydrogenase by the active oxygen species. *J. Pharm. Soc. Korea.* 37, 647 (1993).