

미성숙 랫트와 젊은 성체 랫트간의 생체내 에탄올 대사의 차이

김성연 · 김상겸 · 손영란 · 김영철*

서울대학교 약학대학

(Received April 23, 1997)

A Difference in Ethanol Metabolism Between Premature and Young Adult Rats

Sung Yeon Kim, Sang Kyum Kim, Young Ran Son and Young Chul Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University Seoul 151-742, Korea

Abstract—A difference in ethanol metabolism between premature and young adult rats was examined. Female SD rats, either 4 wk or 12 wk old, were injected with a single dose of ethanol (1.5 g/kg) through jugular vein and the blood ethanol level was monitored for 300 min using a gas chromatographic method. Reduction of blood ethanol level per unit of time was less and the area under the blood concentration-time curve (AUC) was significantly greater in young adults compared to premature rats. Activity of hepatic alcohol dehydrogenase was not influenced by the age increase. Total cytochrome P-450, cytochrome b₅, or aminopyrine N-demethylation was not different between premature rats and young adult rats. However, *p*-nitrophenol hydroxylation and *p*-nitroanisole O-demethylation activities were significantly higher in premature rats. The relative liver weight was 45% greater in premature rats leading to an overall increase in ethanol metabolizing activity in these animals. The results indicate that the reduction in ethanol elimination in young adult rats appears to be mostly associated with the decrease in relative liver weight as the age of animals increases.

Keywords □ premature rats, young adult rats, ethanol, alcohol dehydrogenase, cytochrome P-450 2E1, age difference, *p*-nitrophenol hydroxylation, *p*-nitroanisole O-demethylation, relative liver weight.

전세계적으로 인간의 음주시작 연령은 점차 낮아지고 있으며 동시에 평균 수명의 연장으로 알코올 섭취기간이 길어지고 있다. 알코올에 노출되는 연령층이 넓어짐에 따라 알코올의 폐해를 겪게되는 연령대는 확대될 것이므로 연령증가에 따른 에탄올의 대사능력의 변화와 그 원인을 이해하는 것은 매우 중요한 의미를 갖는다.

연령에 따른 에탄올 대사능력의 변화는 동물종과 성의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. Fisher 344 랫트의 경우 연령증가에 따른 *in vivo* ethanol metabolism의 감소와 독성 증가가 웅성 랫트에서만 관찰되

었으며¹⁾, 웅성 Sprague-Dawley 랫트에서 ethanol oxidation의 감소가 나타났으나²⁾, 다른 연구자들은 웅성 랫트에서 연령증가가 에탄올 대사능력에 변화를 주지 않았음을 보고한 바 있다.³⁾ 한편 이러한 동물의 연령에 따른 에탄올 대사의 차이를 유발하는 원인은 아직도 분명하지 않다.

일반적으로 알코올 대사에서 가장 중요한 역할을 하고 있다고 생각되는 효소인 alcohol dehydrogenase (ADH)의 활성은 출생 후 점차 증가하기 시작하여 생후 4주 이후부터 증가가 둔화되며⁴⁾, 일단 성체에 도달하면 연령이 증가할수록 활성은 저하되는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 한편 체내 알코올 대사에서 비교적 작은 역할을 갖고 있는 microsomal ethanol oxidizing sys-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7852 (팩스) 02-872-1795

tem (MEOS) 을 구성하는 cytochrome P-450 2E1 (CYP 2E1) 은 성별과 연령에 따라 차이를 나타낸다. 이 isozyme 은 female dominant form 이며 출생 직후 가장 높고 성장에 따라 점차 감소하여, 생후 8 주부터는 일정 수준으로 유지된다고 알려져 있다.⁶⁾ 본 연구에서는 자성의 Sprague-Dawley 4 주령의 CYP 2E1 의 활성이 거의 최대에 달한 미성숙 상태의 4 주령의 랫트와 자 성체에 도달한 12 주령의 랫트간에 연령에 따른 에탄올 대사속도의 차이를 측정하고 이와 같은 차이를 유발하는 요인들을 밝히고자 하였다.

실험방법

실험동물

실험 동물로 자성 Sprague-Dawley 랫트를 유한양행 중앙연구소로부터 공급받아 사용하였다. 온도 ($22 \pm 5^\circ\text{C}$), 습도 ($55 \pm 5\%$) 및 환기가 조절된 사육장에서 동물을 사육하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고품 사료와 식수는 자유롭게 공급하였다.

시약

본 실험에 사용된 화학물질은 NADPH, NAD^+ , 4-dimethylaminoantipyrine, p-nitrocatechol, p-nitrophenol, L-ascorbic acid, glycerol, tris(hydroxymethyl)aminomethane, ammonium acetate (이상 Sigma Chemical, U.S.A.), sodium dithionite (Fisher Chemical, U.S.A.), ethyl ether, acetic acid (이상 덕산시약, 한국), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, sodium chloride (이상 Junsei Chemical, Japan), ethanol (Merck, Germany), 1-propanol (Tedia, Japan), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, potassium hydroxide, 4-nitroanisole (이상 Aldrich Chemical, U.S.A.) 등이며 그 외의 모든 시약과 용매는 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

동물처치

에탄올의 혈중농도 측정실험에서는 랫트를 ether 마취한 후 경정맥에 Medical-Grade Tubing (Silaslas[®], 0.25 in ID×0.47 in OD) 으로 심장에 되도록 가까이 근접하여 깊숙이 cannulation 하였다. 이 cannule 을 목 뒷부분으로 유도하여 고정시킨 후 수술부위

를 봉합하였다. 각각의 쥐들은 metabolic cage 에서 48시간 동안 안정시켰으며, 수술 후 매일 heparin (20 unit/ml) 으로 flushing 하여 혈액 응고를 방지하였다. 48 시간 동안 회복시킨 SD 랫트에 에탄올 1.5 g/kg을 10 ml/kg의 volume 으로 경정맥 cannule을 통해 약 1 ml/min 으로 infusion 하였다.

기체크로마토그래피를 이용한 에탄올의 농도분석

혈중 에탄올 농도측정은 Naresh의 방법⁷⁾ 을 변형하여 측정하였다. 동물의 경정맥에 삽입된 cannule 을 통해 채취된 혈액 100 μl 을 filter disc 가 깔린 vial 에 spreading 하고 고무마개와 aluminium cap 으로 밀봉하였다. 25 μl 의 1-propanol 액을 internal standard 로 가하고 vial 을 30 분 이상 방치한 후에 gas tight syringe 로 vial 내부공기 500 μl 을 취해 flame ionization detector (FID)를 장착한 Varian 3300 GC에 주입하였다. Carrier gas 로는 N_2 (25 ml/min) 를 사용하였으며, 그 외 H_2 와 compressed air 의 flow rate 는 각각 30 ml/min, 300 ml/min로 유지하였다. 컬럼은 carbowax 20 M (steel column) 을 사용하였다. 컬럼 온도는 110°C , 인젝터 온도 130°C , 디텍터 온도 150°C 로 설정하였다.

AREA UNDER THE BLOOD CONCENTRATION TIME CURVE (AUC) 의 측정

Area under the blood concentration time curve (AUC) 의 측정은 time 0 에서부터 마지막 시간까지 detect 된 에탄올의 농도로부터 trapezoidal rule extrapolation 방법⁸⁾ 을 이용하여 구했으며, 마지막으로 에탄올이 detect 된 시간으로부터 무한대 시간까지의 에탄올의 AUC는 non-linear equation 을 사용했다.⁹⁾

간대사 효소계 활성 측정

적출된 간에 3배 용량의 homogenizing buffer (1 mM 의 EDTA 와 50 mM의 Tris-HCl 을 포함하는 0.154 M KCl 용액, pH 7.4)를 가하여 분쇄한 후 4°C , 10,000 g 로 20 분간 원심분리하고 상등액을 취하여 4°C , 105,000 g 에서 1시간 동안 초원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액 (cytosol)은 alcohol dehydrogenase 활성 측정에 사용하였다. Microsomal pellet 은 buffer에 재분산하고 4°C , 105,000 g 에서 1시간 동안 재원심분리하였다. 간의 microsomal cytochrome

P-450 content 와 cytochrome b₅ content 측정은 Omura 와 Sato¹⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. Cytochrome P-450 은 450 nm 와 490 nm 의 흡광도 차이로, cytochrome b₅ content 는 424 nm 와 409 nm 의 흡광도 차이로부터 측정하였다. Aminopyrine N-demethylase 활성은 반응생성물인 formaldehyde 를 Nash 의 방법⁷⁾에 의거하여 발색시켜 측정하였다. *p*-Nitroanisole O-demethylase 의 활성은 Shigematsu 등의 방법¹²⁾에 따라 생성물인 *p*-nitrophenol 을 4 N 의 KOH 로 발색시켜 측정하였다. *p*-Nitrophenol hydroxylase 활성은 Koop 의 방법¹³⁾에 의거하여 10 N 의 NaOH 에 의해 발색된 4-nitrocatechol 의 생성량으로 측정하였다. 단백질함량은 Lowry 등의 방법¹⁴⁾으로 정량하였다.

ALCOHOL DEHYDROGENASE의 활성 측정

Alcohol dehydrogenase 의 활성은 Crow¹⁵⁾의 방법을 사용해 측정하였다. 340 nm 에서 약 5 분간 NAD⁺의 환원으로 나타나는 흡광도의 변화를 37°C 에서 측정하였다. Alcohol dehydrogenase 의 활성은 단위시간당 NAD⁺ (μmole) 의 환원량으로 나타냈다.

통계처리

실험결과는 각 군의 평균±표준편차로 표시하였으며 two tailed student's *t*-test 를 실시하여 유의성을 검정하였다. 따로 기술하지 않는 한 *p*(0.05)인 경우 유의성있는 차이가 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

4 주령의 미성숙 랫트와 12 주령의 젊은 성체 랫트에 에탄올 (1.5 g/kg) 을 jugular vein을 통하여 infusion 한 후 혈중의 에탄올 농도의 변화를 관찰하였다 (Fig. 1). 혈중 에탄올이 측정된 전 시간대에 걸쳐 두 연령 군간에 에탄올 혈중농도의 차이는 없는 것으로 보이나 시간당 에탄올 혈중농도의 감소량은 성체 랫트에서 미성숙 랫트에 비해 유의적으로 감소하였다 (Table I). 또 혈중 에탄올의 시간당 감소량으로 부터 계산한 area under the blood concentration-time curve (AUC) 는 12 주령의 랫트에 비해 4 주령의 랫트에서 현저하게 낮은 것으로 관찰되었다.

생체내 에탄올을 대사에 중요한 영향을 줄 수 있는 효소

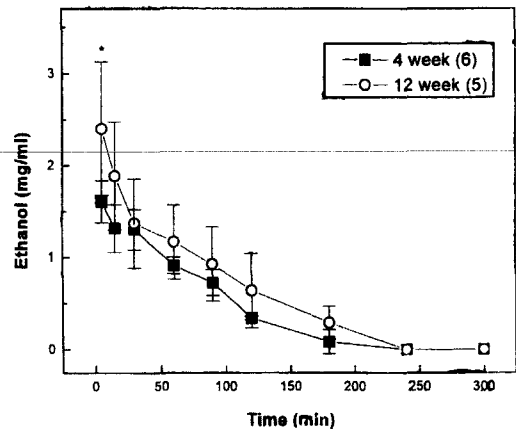


Fig. 1—Decrease in blood concentration of ethanol in 4 week old and 12 week old rats.

Blood ethanol concentrations were measured for 300 min after an intravenous administration of ethanol (1.5 g/kg). Each value represents the mean±S.D. for the number of rats indicated in the parentheses. *Significantly different from the 4 week old rats (Student's *t*-test, *p*<0.05).

활성 및 관련인자들을 측정하였다. 에탄올 대사에서 가장 큰 역할을 하는 hepatic alcohol dehydrogenase activity 를 측정한 결과 두 연령층에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table II). 두 연령층의 랫트의 hepatic microsome을 분리하여 4 주령의 랫트와 12 주령의 랫트간의 microsomal monooxygenase 활성의 지표들을 비교시 cytochrome P-450 함량과 cytochrome b₅ 함량은 유의성있는 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 간의 microsome의 약물대사활성을 측정한

Table I—The rate of ethanol elimination *in vivo* and the area under the blood concentration-time curve (AUC)

Age of Rats	Ethanol	AUC
	Elimination Rate (mg/ml/hr)	(mg min/ml)
4 week (6)	0.578±0.020	124.47±15.50
12 week (5)	0.442±0.053**	215.55±14.06***

The ethanol elimination rate was calculated from the blood ethanol concentrations at 30 to 180 min following an intravenous administration of ethanol (1.5 g/kg) to each rat. The AUC was obtained from the overall blood ethanol concentration time curve. Each value represents the mean±S.D. for the number of rats indicated in the parentheses.

** *** Significantly different from the 4 week old rats (Student's *t*-test, *p*<0.01, 0.001).

Table II — Various parameters for ethanol metabolising activity

Age of Rats	Alcohol Dehydrogenase	Cytochrome P-450	Cytochrome b ₅	p-Nitrophenol Hydroxylation	p-Nitroanisole O-Demethylation	Aminopyrine N-Demethylation	Relative Liver Weight (%)
	(μ mole/mg protein/min)	(nmol/mg	protein)	(nmol	product/mg	protein/min)	
4 week	0.039 \pm 0.020	0.44 \pm 0.02	0.47 \pm 0.05	1.81 \pm 0.12	1.07 \pm 0.07	4.30 \pm 0.40	4.85 \pm 0.02
12 week	0.037 \pm 0.007	0.49 \pm 0.02	0.42 \pm 0.04	1.41 \pm 0.18*	0.82 \pm 0.08*	3.86 \pm 0.16	3.35 \pm 0.16**

Each value represents the mean \pm S.D. for 3 pooled samples each made of livers from two rats except for relative liver weight which is the mean of 6 individual rats. *,**Significantly different from the 4 week old rats (Student's *t*-test, *p*<0.05, 0.01).

결과 p-nitrophenol hydroxylase 활성과 p-nitroanisole O-demethylase 의 활성이 성체 랫트에서 유의적으로 감소하였다. 그러나 aminopyrine demethylase 의 활성은 연령간에 유의적 차이를 보이지 않았다. 한편 체중당 간의 는 4 주령의 랫트와 12 주령의 랫트에서 각각 4.85 \pm 0.34%와 3.35 \pm 0.28% 로 4 주령의 랫트에서 1.4 배정도 큰 것으로 관찰되었다.

고 찰

본 실험에서 사용된 4 주령의 미성숙상태의 랫트와 12 주령에 달한 젊은 성체 랫트간에 급성적인 에탄올의 정맥투여에 의한 혈중농도는 측정된 전 시간대에서 차이를 보이지 않았다. 그러나 시간당 에탄올 혈중농도 감소량은 12 주령의 랫트에서 유의적으로 감소하여 미성숙 랫트는 성체 랫트로 성장함에 따라 생체내 에탄올 대사활성은 저하됨을 보였다. Area under the blood concentration-time curve (AUC) 또한 12 주령의 젊은 성체 랫트에 비해 4 주령의 미성숙 랫트에서 현저하게 낮은 것으로 관찰되었다.

연령증가에 따른 에탄올 대사능력의 감소는 웅성의 Sprague-Dawley 랫트²⁾와 웅성의 Fisher 344 랫트에서도 나타나는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 그러나 자성의 Fisher 344 랫트와 웅성 Charles River Sprague-Dawley 랫트에서는 연령에 따른 에탄올 대사능력의 변화는 없는 것으로 보고되고 있다.³⁾ 이와 같이 서로 일치하지 않는 실험결과들은 동물의 에탄올 elimination rate는 성과 종, 또는 혈통 (strain) 에 영향을 받음을 암시하고 있다.

Hahn과 Burch는 웅성 SD 랫트의 경우 연령증가에 따른 혈중 알코올 소실속도의 감소의 원인이 에탄올 대사의 주요 효소인 hepatic alcohol dehydrogenase 활성 저하와 관련있음을 주장하였다.²⁾ 그러나 Fisher

344 랫트에서 연령증가에 따라 specific alcohol dehydrogenase 활성은 변화하지 않았으나 ethanol elimination rate 는 감소하였다.¹⁾

Alcohol dehydrogenase (ADH) 는 생체내에 흡수된 에탄올을 대사분해하는 가장 중요한 enzyme 이다. ADH 의 연령에 따른 활성의 변화는 아직까지 알려진 것이 많지 않으나, 출생 후 점차 증가하기 시작하여 생후 4주 이후부터 증가가 둔화되며⁴⁾ 연령이 증가할수록 활성은 떨어지는 것으로 보고되어 있다.⁵⁾

생체내 에탄올 대사분해에 관여하는 또다른 중요한 효소계로 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)가 존재한다. 체내 에탄올 대사의 10~20%를 담당하는 것으로 알려진 MEOS는 산소와 NADPH를 cofactor로 사용하여 에탄올을 acetaldehyde로 대사시키며, 장기적인 에탄올 섭취로 인하여 유도되는 것으로 알려져 있다. CYP 2E1은 MEOS의 주요 효소로 기질은 주로 소분자 물질들과 reactive polar compound 이며 간세포의 centrilobular region에 많이 분포하는데, 에탄올에 의한 hepatotoxicity가 centrilobular region에 집중되는 것과 유관해 보인다.¹⁶⁾ CYP 2E1은 성별과 연령에 따라서도 차이를 나타낸다. 즉, 이 isozyme은 female dominant form 이며 출생 직후 가장 높고 성장에 따라 점차 감소하여 생후 8주 후에는 일정 수준으로 유지된다고 알려져 있다.⁶⁾

본 연구실험에서 자성 SD 랫트의 연령에 따른 에탄올 대사속도 차이의 기전을 밝히기 위해 에탄올 대사에 영향을 줄 수 있는 주요 요인들을 측정된 결과 에탄올 대사의 주 효소인 alcohol dehydrogenase 활성은 두 연령층에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또 hepatic microsome을 분리하여 간의 약물대사능력을 측정된 결과 microsomal ethanol oxidizing system 을 구성하는 CYP 2E1 의 활성과 연관있는 p-nitrophenol hydroxylation과 p-nitroanisole O-deme-

thylation 활성이 미성숙 랫트에서 성체 랫트에 비해 현저히 높은 것으로 관찰되었으며, 이 결과는 타 연구자의 결과와 일치하고 있다.⁶⁾

본 연구실험에서 에탄올의 체내 대사에 가장 중요한 역할을 하는 ADH 활성은 이 효소가 존재하는 cytosol 내 protein 당 활성으로 표시하였을 때 두 연령층간에 차이를 보이지 않았다. 그러나 미성숙 랫트와 젊은 성체 랫트의 체중에 대한 간 중량의 비는 약 1.4 로서 (Table II), 미성숙 랫트는 성체에 비해 현저하게 큰 간 조직을 갖고 있는 것으로 관찰되었다. 이 결과는 에탄올의 체내대사가 주로 hepatic tissue 에서 일어난다는 것을 고려하면¹⁷⁾ 미성숙 랫트는 젊은 성체 랫트에 비해 체중당 간 중량의 차이에 상응하는 정도로 높은 생체내 에탄올 대사능력을 갖고 있음을 의미하며 이 차이는 본 실험에서 약 1.3 으로 관찰된 미성숙 랫트와 젊은 성체 랫트간의 ethanol elimination rate 의 비와 (Table I) 거의 일치한다.

한편 *p*-nitrophenol hydroxylation과 *p*-nitroaniline demethylation 으로 반영된 미성숙 랫트에서 상대적으로 높은 CYP 2E1의 활성이 본 연구실험에서 관찰된 에탄올 대사속도의 증가에 어느 정도 기여하였는지는 분명하지가 않다. 그러나 미성숙 랫트와 젊은 성체 랫트간의 시간당 에탄올 대사량의 차이는 두 연령층의 상대 간 중량의 차이보다 오히려 작으므로 에탄올 대사속도의 차이에 MEOS 의 역할은 거의 없거나 대단히 낮은 것으로 추정된다.

본 연구결과를 요약하면 자성의 미성숙 상태의 랫트는 성체 랫트에 비해서 현저하게 높은 에탄올 대사능력을 가지나 이것은 단위조직중량당 에탄올 대사효소활성의 차이보다는 주로 상대적 간 중량의 차이에 기인한 총 에탄올 대사능력의 차이에 의해 유발되는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구과제는 부분적으로 서울대학교 신의약품개발 연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

문 헌

- 1) Seitz, H. K., Meydani, M., Fersghke, I., Simanowski, U. A., Boesche, J., Bogusz, M., Hoepker, W. W., Blumberg, J. B. and Russell, R. M. : Effect of aging on *in vivo* and *in vitro* ethanol metabolism and its toxicity in F344 rats. *Gastroenterology* **97**, 446 (1989).
- 2) Hahn H. J. K and Burch R. E. : Impaired ethanol metabolism with advancing age. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **7**, 299 (1983).
- 3) York, L. : Increased responsiveness to ethanol with advancing age in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **19**, 687 (1983).
- 4) Pushkaraj J. LAD, Shoemaker, W. J. and Lettert, H. L. : Developmental changes in rats liver alcohol dehydrogenase. *Dev. Biol.* **105**, 526 (1984).
- 5) Mendenhall, C. L., Rouster, S. D., Grossman, C. J., Roselle, G. A., Ghosn, S. and Gartside, P. : The impact of age on alcohol toxicity in the rat. *Alcohol Alcohol.* **28**, 675 (1993).
- 6) Tomas, P. E., Bandiera, S., Maines, S. L., Ryan, D. E. and Levin, W. : Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity N-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsome. *Biochem.* **26**, 2280 (1987).
- 7) Naresh, C. and Robert, H. : Analysis of alcohol 2. A review of gas chromatographic method. *J. Chromatogra. Sci.* **10**, 263 (1972).
- 8) Chiou, W. L. : Critical evaluation of potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level-time curve. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**, 539 (1978).
- 9) Wagner, J. G. : Lack of first-pass metabolism of ethanol of blood concentration in social drinking range. *Life Sci.* **39**, 407 (1986).
- 10) Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).
- 11) Nash, T. : The colorimetric estimation of HCHO by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**, 415 (1971).
- 12) Shigematsu, H., Yamano, S. and Yoshimura, H. : NADH-dependent O-deethylation of *p*-nitrophenetole with rabbit liver microsome. *Arch.*

- Biochem. Biophys.* **173**, 178 (1976).
- 13) Koop, D. R. : Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol. Pharmacol.* **29**, 399 (1986).
 - 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. G., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 - 15) Crow, K. E. and Hardman, M. J. : Regulation of rates of ethanol metabolism, in *Human Metabolism of Alcohol*, Crow, K. E. and Batt, R.D. (eds), vol II. FL, CRC press, 3 (1989).
 - 16) Hepat, J. R., Guengerich, F. P., Bend, J. R., and Correia, M. A. : Selective inhibitors of cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 163 (1994).
 - 17) Boleda, M. D., Julia, P., Moreno, A. and Pares, X. : Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 74 (1989).