J. Fd Hyg. Safety 11(4), 291 - 297(1996)

급성적인 알콜성 지방간 생성에서 Cytochrome P-450 2E1의 역할에 관한 연구

김성연 · 김상겸 · 강경애 · 김영철†
서울대학교 약학대학

Lack of Evidence for Involvement of Cytochrome P-450 2E1 in Acutely Induced Alcoholic Fatty Liver

Sung Yeon Kim, Sang Kyum Kim, Kyoung Ae Kang and Young Chul Kim†
College of Pharmacy, Seoul National University
San 56-1 Shinrim-Dong, Kwanak-Ku, Seoul, Korea

ABSTRACT—The role of cytochrome P-450 2E1 (P450 2E1) in the early phase of alcoholic fatty liver was examined. Female rats were pretreated with either allyl sulfide (200 mg/kg, po), disulfiram (500 mg/kg, po), YH 439 (250 mg/kg, po) or pyrazine (200 mg/kg/day × 2 days, ip). Marked changes in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and carboxyhemoglobin (COHb) elevation due to dichloromethane administration were observed in rats treated with one of the P450 2E1 modulators. A single dose of ethanol (6 g/kg, po) increased the hepatic triglyceride contents approximately 2 fold, which was inhibited completely by YH 439 pretreatment. However, the other P450 2E1 modulators failed to alter the ethanol-induced hepatic triglyceride accumulation. *In vitro* hepatic microsomal enzyme activity was determined in 4 week old premature and 12 week old adult rats. Aminopyrine-N demethylation was not different, but *p*-nitrophenol hydroxylation and *p*-nitroanisole O-demethylation were significantly higher in premature rats compared to adult indicating that the P450 2E1 activity decreases with the maturity of rats. However, no difference in the triglyceride accumulation induced by an intraperitoneal dose of ethanol (3 g/kg) was noted between premature and adult rats. The results suggest that the P450 2E1 activity dose not play an important role in the induction of acute alcoholic fatty liver.

Key words □ Ethanol, Fatty liver, Triglyceride, Carbon tetrachloride, Dichloromethane, Cytochrome P-450 2E1

알코올성 음료의 주성분인 ethanol 의 부작용에 대해서는 음주의 역사만큼이나 오랫동안 논의되어 왔으며, 특히 급성 또는 만성적인 alcohol 섭취에 의한 간질환에 대해서 현재까지 많은 연구가 진행되어 왔다. Ethanol 섭취는 실험동물과 인간에게서 지방간을 생성하며 만성적인 노출시에는 간의 섬유화를 거쳐 간경화를 유발시킴이 잘 알려져 있다.[1]

지방간은 ethanol에 의한 간질환의 초기 단계에 나타나는 가장 흔한 가역적인 병변이다. 지방간은 간세포 내에 triglyceride의 함량이 증가하는 현상으로 adipose tissue로 부터 저장지방의 이동증가, 대사변동으로 인한 triglyceride의 합성증가, 간세포로 부터의 지질단백의 방출저하 등에 의해 유발되는 것으로 보인다.[2] 그러나 alcohol성 지방간 생성의 underlying mechanism은 지속적인 연구에도 불구하고 아직 정확히 밝혀지지 않고 있다. 최근 지방간 생성의 기전으로 ethanol 대사시 유발되는 oxidative stress 에 의한 lipid peroxidation이 제안되고 있으며 이러한 oxidative stress 에 cytochrome P-450 2E1 (P450 2E1) 의 활성이 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다.[3,4]

본 연구에서는 급성적인 ethanol 투여에 의한 지방간 유발시 cytochrome P-450 2E1의 역할을 랫트에서 실험하였다. 실험동물의 P450 2E1 활성을 변화시키기 위해서 P450 2E1 inhibitor인 disulfiram, allyl sulfide 또는 isopropyl 2-(1, 3-dithietane-2-ylidene-2-[N-methylthiazole-2-yl) carbamoyl]

†Author to whom correspondence should be addressed

acetate (YH 439)나 P450 2E1 inducer로 pyrazine 을 사용하였다.[5-7] 이들 물질들이 생체내 P450 2E1 활성에 주는 영향을 확인하기 위해 이 isozyme 에 의해 주로 매개되는 사염화탄소의 간독성과 이염화메탄에 의한 carboxyhemoglobin (COHb) 생성을 측정하였다.[8,9] 또 생체내 P450 2E1 활성은 동물이 adolescence 를 거치면서 급격히 변화하는 것으로 알려져 있으므로[10] 이 시점 전후에서 급성적인 ethanol에 의한 지방간 생성을 비교실험하였다.

재료 및 방법

실험동물

자성 Sprague-Dawley 랫트를 (주) 유한양행으로부터 공급받아 실험동물로 사용하였다. 젖을 갓 뗀 상태에서 분양받은 동물을 본 대학 사육실에서 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실은 온도 22±2°C의 환경을 유지하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고형사료와 물은 자유롭게 섭취시켰다.

시약

본 연구실험에 사용한 시약은 disulfiram, tris (hydroxymethyl)aminomethane, *p*-nitrophenol, 4-nitrocatechol, aminopyrine (이상 Sigma Chemical Co., U.S.A.), sodium dithionite, dichloromethane (이상 Fisher Chemical Co., U.S.A.), 사염화탄소, sodium chloride (이상 Junsei Chemical Co., Japan), allyl sulfide, pyrazine, acetylacetate, formaldehyde (이상 Aldrich Chemical Co., Germany), ethanol (Merck, Germany), sodium carboxymethylcellulose (Shimakyu's Pure Chemicals, Japan), YH 439 (유한양행 중앙연구소) 등이며 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

약물투여

Disulfiram (500 mg/kg, po) 또는 YH 439 (250 mg/kg, po)는 ethanol (6 g/kg, po)을 투여하기 4시간 전에, allyl sulfide (200 mg/kg, po)는 ethanol 투여 24시간 전에 일회 투여하였다. Pyrazine (200 mg/kg, ip)은 하루에 1회씩 2일 동안 투여하고 24시간 후에 ethanol을 투여하였다. P450 2E1 modulator들을 이용한 실험에서는 ethanol 투여 18시간 후에, ethanol에 의한 지방간 생성의 연령차이를 측정한 실험에서는 ethanol (3 g/kg, ip) 투여 6시간 후에 간을 절취하였다. P450 2E1의 *in vivo* 활성을 측정하기 위하여 이염화메탄(3 mmol/kg, ip) 또는 사염화탄소(4 mmol/kg, ip) 를 일회 투여하고 COHb 농도와 간독성을 각각 측정하였다. Disulfiram, allyl sulfide, 이염화메탄 그리고 사염화탄소는 corn oil에, pyrazine과 ethanol은 생리식염수에 용해시켰으며 YH 439는 sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na)에 현탁시켜 투여하였다.

Assay

간독성 측정 — 복대동맥에서 채취된 혈액에서 분리한 혈청으로부터 간독성의 지표로 GPT (glutamic pyruvic transaminase), GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)와 SDH (sorbitol dehydrogenase)의 활성을 측정하였다. GOT와 GPT의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법으로[11] UV-spectrophotometer (Beckman DU650)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준검량선으로부터 구하였다. SDH 활성은 Gerlach의 방법에[12] 의거하여 366 nm에서 1분간의 흡광도 변화로 측정하였다.

혈중 COHb 측정 — 혈중 COHb 농도는 Rodkey 등의 방법을[13] 이용하여 spectrophotometer로 측정하였다. Capillary로 랫트의 orbital sinus에서 채취된 혈액을 sodium dithionite를 가한 10 mM Tris 용액으로 약 1,500배로 희석하였다. 이 혈액희석액으로 cuvette을 채우고 capping한 다음 420 nm 및 432 nm에서 흡광도를 측정하여 COHb (%) 농도를 계산하였다.

지방간 측정 — 간 triglyceride 함량은 Van Handel과 Zilversmit의 방법을[14] 약간 변형시켜 측정하였다. Ethanol을 투여하고 6 또는 18시간 후 간을 적출하여 chloroform 으로 추출한 후 saponification에 의해 생긴 glycerol을 산화시키고 chromotropic acid를 가해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cholesterol 함량 측정은 Zlatis와 Zak의 방법을[15] 변형하여 측정하였다. 간을 적출하여 chloroform과 methanol (2:1)로 추출한 후 *o*-phthalaldehyde를 가하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간대사효소계 활성 측정 — 적출된 간에 3배 용량의 homogenizing buffer (1 mM의 EDTA와 50 mM의 Tris-HCl을 포함하는 0.154 M KCl 용액, pH 7.4) 를 가하여 분쇄한 후 4°C, 10,000 g로 20분간 원심분리하고 상등액을 취하여 4°C, 105,000 g에서 1시간 동안 초원심분리하였다. 여기서 얻은 microsomal pellet을 buffer에 재분산하고 4°C, 105,000 g에서 1시간 동안 재원심분리하였다. Aminopyrine N-demethylase 활성은 반응생성물인 formaldehyde를 Nash의 방법에[16] 의거하여 발색시켜 측정하였다. *p*-Nitroanisole O-demethylase 의 활성은 Shigematsu 등의 방법에[17] 따라 생성물인 *p*-nitrophenol을 4 N의 KOH로 발색시켜 측정하였다. *p*-Nitrophenol hydroxylase 활성은 Koop의 방법에[18] 의거하여 10 N의 NaOH에 의해 발색된

4-nitrocatechol의 생성량으로 측정하였다. Protein content는 Lowry 등의 방법에[19] 의거하여 정량하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 각 군간의 차이는 one-way ANOVA 후 Newman-Keuls multiple range test를 실시하던가 two-tailed Student's *t*-test로 유의성을 검정하였다. 따로 기술하지 않은 한 $P<0.05$ 인 경우 유의성있는 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

P450 2E1 modulators가 사염화탄소와 이염화메탄의 독성에 미치는 영향

4 mmol/kg 용량의 사염화탄소 투여는 혈청내 간독성 지표인 GOT, GPT 그리고 SDH의 활성을 대조군에 비하여 유의성있게 증가시켰다(Table 1). Allyl sulfide (200 mg/kg), YH 439 (250 mg/kg)와 disulfiram (500 mg/kg)은 모두 사염화탄소에 의해 유도되는 GOT, GPT와 SDH의 상승을 현격하게 감소시켰다. 반면 pyrazine 은 사염화탄소에 의한 혈청내 지표의 상승을 10배 정도로 유의성있게 증가시켰다.

이염화메탄은 3 mmol/kg 용량으로 투여시 혈중 COHb level을 유의성있게 상승시키며 최대 peak level은 약 2시간 경과시에 도달하였다(data not shown). 따라서 본 실험에서는 이염화메탄을 투여하고 2시간 경과시 혈중 COHb level을 측정하였다(Fig. 1). Allyl sulfide, YH 439와 disulfiram의 전투여는 모두 혈중 COHb의 농도를 정상수준으로 완전히 억제하였다. 반면 pyrazine은 COHb의 농도를 약 15%로 이염화메탄만을 투여한 동물에 비해 유의성있게 증가시켰다.

Table 1. The effects of P450 2E1 modulators on the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity[a]

	GOT (unit/m*l*)	GPT (unit/m*l*)	SDH (unit/m*l*)
Control (5)	65.4 ±11.5	27.5 ±5.8	12 ±12
CCl_4 (5)	305.2 ±96.8	358.7 ±270.6	677 ±581
Allyl Sulfide+CCl_4 (5)	111.4 ±19.6**	62.5 ±43.7*	40 ±20*
YH 439+CCl_4 (5)	97.8 ±19.9**	54.4 ±7.0*	22 ±10*
Disulfiram+CCl_4 (5)	83.9 ±19.7**	39.5 ±13.6*	12 ±21*
Pyrazine+CCl_4 (4)	3544.2 ±809.9***	3133.7 ±1219.3**	4682 ±789.6***

[a]Rats were treated with CCl_4 (4 mmol/kg, ip) 4 hr following YH 439 (200 mg/kg, po) or disulfiram (500 mg/kg, po), or 24 hr following allyl sulfide (200 mg/kg, po) pretreatment. Pyrazine (200 mg/kg/day, ip) was given to rats for 2 consecutive days followed by CCl_4 (4 mmol/kg, ip) treatment 24 hr after the final dose of pyrazine. Blood was sampled 24 hr following the CCl_4 treatment. Each value represents the mean±S.D. for the number of rats indicated in the parentheses.

*,**,*** Significantly different from the rats treated with CCl_4 only (Student's *t*-test, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, respectively).

급성적인 ethanol에 의한 지방간 생성에 P450 2E1 modulators가 미치는 영향

6 g/kg 용량의 ethanol 일회 투여는 18시간 후 지방간의 지표인 간조직의 triglyceride 함량을 생리식염수만 투여한 대조군에 비하여 2배 이상으로 증가시켰다(Table 2). 또한 간조직내의 cholesterol 함량 역시 유의성있게 증가하였다.

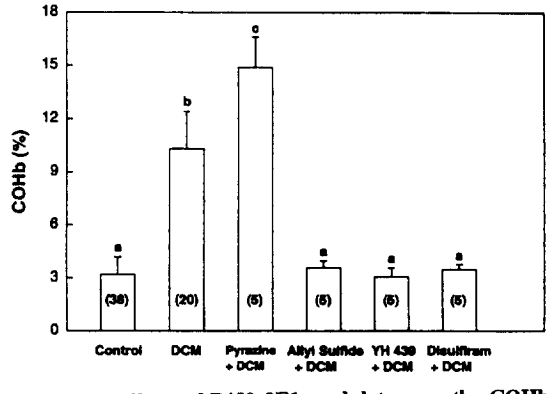

Fig. 1. The effects of P450 2E1 modulators on the COHb elevation induced by DCM.

Rats were treated with DCM (3 mmol/kg, ip) 4 hr following YH 439 (200 mg/kg, po) or disulfiram (500 mg/kg, po), or 24 hr following allyl sulfide (200 mg/kg, po) pretreatment. Pyrazine (200 mg/kg/day, ip) was given to rats for 2 consecutive days followed by DCM treatment 24 hr after the final dose of pyrazine. The COHb level was determined 2 hr following the DCM treatment. Each value represents the mean±S.D. for the number of rats indicated in the parentheses. The COHb levels with different superscripts are significantly different (one-way ANOVA, $P<0.05$).

Table 2. The effects of P450 2E1 modulators on the hepatic triglyceride and cholesterol level in rats treated with a single dose of ethanol[a]

	Control (10)	Ethanol (35)	Allyl sulfide+ Ethanol (9)	YH 439+ Ethanol (10)	Disulfiram+ Ethanol (9)	Pyrazine+ Ethanol (11)
Triglyceride (mg/g liver)	10.7±1.8	22.8±3.5	24.2±6.5	11.5±1.3***	23.0±3.6	26.0±10.5
Cholesterol (mg/g liver)	5.9±0.6	7.7±1.4	6.7±1.7	7.6±0.3	8.6±1.3	8.8±1.6*

[a]Rats were treated with ethanol (6 g/kg, po) 4 hr following YH 439 (200 mg/kg, po) or disulfiram (500 mg/kg, po), or 24 hr following allyl sulfide (200 mg/kg, po) pretreatment. Pyrazine (200 mg/kg/day, ip) was given to rats for 2 consecutive days followed by ethanol (6 g/kg, po) treatment 24 hr after the final dose of pyrazine. Rats were sacrificed for the assay 18 hr following the ethanol treatment. Each value represents the mean±S.D. for the number of rats indicated in the parentheses.

*,*** Significantly different from the rats treated with ethanol only (Student's *t*-test, P<0.05, P<0.001, respectively).

Table 3. Difference in the hepatic microsomal enzyme activities between 4 week old and 12 week old rats

Age of Rats	*p*-Nitrophenol Hydroxylation	*p*-Nitroanisole O-Demethylation	Aminopyrine N-Demethylation
	product nmol/mg protein/min		
4 week	2.21±0.40	1.83±0.09	6.29±0.43
12 week	1.26±0.09*	1.54±0.13*	5.47±0.29

Each value represents the mean±S.D. for 3 pooled samples each made of livers from two rats.

*Significantly different from the 4 week old rats (Student's *t*-test, P<0.05).

YH 439는 급성적인 ethanol 투여에 의한 간 triglyceride 증가를 완전히 차단하였으나 cholesterol 함량의 증가에는 변화를 유도하지 못하였다. Allyl sulfide와 disulfiram은 ethanol에 의한 triglyceride 와 cholesterol의 함량증가에 영향을 주지 못하였다. Pyrazine은 ethanol에 의한 cholesterol의 함량증가를 유의성있게 상승시켰으나 지방간의 대표적인 지표인 triglyceride의 함량에는 영향을 주지 못하였다.

연령증가가 대사활성과 ethanol에 의한 지방간 생성에 미치는 영향

본 실험에서는 4주령과 12주령의 자성 랫트의 간에서 microsomes을 분리하여 P450 2E1 활성의 대표적인 지표인 *p*-nitrophenol hydroxylation과 *p*-nitroanisole O-demethylation 그리고 aminopyrine N-demethylation 활성의 차이를 측정하였다(Table 3). Aminopyrine N-demethylase의 활성은 연령에 따른 차이가 관찰되지 않았으나 *p*-nitroanisole O-demethylase와 p-nitrophenol hydroxylase 활성은 연령증가에 따라 현저하게 감소하였다. 특히 P450 2E1의 specific substrate인 *p*-nitrophenol의 대사활성은 4주령 랫트가 12주령에 비하여 180% 정도로 높았다.

Table 4. Increased hepatic triglyceride and cholesterol level by a single dose of ethanol in 4 week old and 12 week old rats.[a]

Age of Rats	4 week		12 week	
	Control (10)	Ethanol (10)	Control (10)	Ethanol (10)
Triglyceride (mg/g liver)	16.00 ±3.82	24.37 ±4.86***	15.86 ±3.83	23.99 ±8.73*
Cholesterol (mg/g liver)	5.14 ±0.80	6.69 ±1.06**	5.20 ±0.85	5.45 ±0.79

[a]Rats were sacrificed for the assay 6 hr following the ethanol (3 g/kg, ip) treatment. Each value represents the mean±S.D. for the number of rats indicated in the parentheses.

*,**,*** Significantly different from the control group (Student's *t*-test, P<0.05, P<0.01, P<0.001, respectively).

Ethanol은 3 g/kg 용량으로 일회 복강투여하였을 때도 4주령과 12주령의 랫트에서 triglyceride 함량을 증가시켜 지방간을 유도하였다(Table 4). 그러나 4주령과 12주령의 동물군 사이에 ethanol에 의한 지방간 생성에는 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

고 찰

지방간은 화학물질에 의해 유발되는 간질환의 초기현상으로 가역적인 병변이며 ethanol은 대표적인 지방간 유발물

질 중 하나다. 알콜성 지방간 생성과정에서는 ethanol의 체내대사 중에 유발되는 oxidative stress에 의한 lipid peroxidation이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.[20] P450 2E1은 *in vitro*에서 reactive oxygen species 생성과 lipid peroxidation 유발 능력이 다른 isozyme에 비해 큰 것으로 보고되어 있으며 따라서 P450 2E1 활성과 ethanol에 의한 간독성과의 연관성이 주목받고 있다.[21] 실제로 최근 P450 2E1 inhibitor로 알려진 phenyl isothiocyanate (PIC)와 allyl sulfide는 일개월 동안의 반복적인 ethanol 투여에 의한 *in vivo* lipid peroxidation의 증가와 지방산 조성의 변화 및 지방간 생성을 억제하는 것으로 보고되었다.[22,23]

본 연구에서는 급성적인 ethanol 투여에 의한 지방간 생성에 P450 2E1 활성의 역할을 확인하기 위해 이 isozyme 활성에 영향을 주는 물질을 전처리하던가 또는 연령차이에 의해 생리적으로 P450 2E1 활성에 차이를 보이는 동물을 대상으로 하여 ethanol의 작용을 실험하였다. 대표적인 aldehyde dehydrogenase inhibitor인 disulfiram은 마우스와 랫트에서 간의 P450 2E1 함량과 P450 2E1의 활성 지표인 nitrosodimethylamine N-demethylation을 감소시킨다.[5] Allyl sulfide는 garlic oil의 성분으로 animal model에서 화학물질에 의한 독성과 발암을 억제하며 P450 2E1 inhibition이 중요한 작용기전으로 보고되었다.[6] YH 439는 간장보호제로 개발 중인 물질로 사염화탄소에 의한 간독성을 억제하며 그 기전은 P450 2E1 inhibition 효과와 관련이 있는 것으로 추정된다.[7] 한편 pyrazine은 반복투여시 간의 P450 2E1 induction 효과가 있는 물질로 알려져 있다.[7,24]

본 실험에서는 먼저 P450 2E1의 *in vivo* 활성을 사염화탄소에 의한 간독성과 이염화메탄에 의한 혈중 COHb 농도 상승을 지표로 이용하여 측정하였다. 사염화탄소의 궁극적인 독성 대사체로의 전환에는 P450 2E1이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.[8] 이염화메탄은 다른 halogenated hydrocarbon에 비해 간과 신장독성은 비교적 낮으나 생체 내에서 cytochrome P-450에 의해 대사되어 일산화탄소를 생성시켜 COHb 농도를 상승시키며 이 반응은 P450 2E1의 활성에 의존적인 것으로 보고되었다.[9] 본 실험에서 사용된 P450 2E1 modulator들은 사염화탄소의 간독성과 이염화메탄에 의한 혈중 COHb의 농도상승을 현격하게 변화시켰다. 그러므로 이 물질들은 본 실험에 사용된 용량과 방법에 의해 *in vivo*에서 실제로 P450 2E1의 활성을 현저하게 변화시키는 것으로 보인다. 그러나 P450 2E1 modulator들은 급성적인 ethanol 투여에 의해 유도되는 간 triglyceride 함량 증가에 일관성있는 변화를 유발하지 못하였다. 즉, 사염화탄소의 간독성과 이염화메탄에 의한 COHb 생성을 억제한 YH 439는 ethanol에 의한 triglyceride 함량 증가를 약 50% 정도로 억제하여 정상수준을 유지시켰으나 YH 439와 같은 정도로 사염화탄소 및 이염화메탄의 독성을 억제한 allyl sulfide와 disulfiram은 급성적인 ethanol 투여에 의한 지방간 생성에 아무런 영향도 주지 못하였다. 한편 사염화탄소 간독성과 이염화메탄에 의한 COHb 증가를 현저히 상승시킨 pyrazine도 ethanol에 의한 triglyceride 증가에 변화를 주지 않았다.

Cytochrome P-450 genes의 발현은 연령이나 성별에 따라 다르게 표현된다.[25] P450 2E1은 출산 후 급격히 증가하며, 젖을 뗀 후에는 감소하는 것으로 보고되었다.[10,26] 이 실험에서 3주령의 랫트는 8주령에 비해서 P450 2E1의 함량과 P450 2E1의 선택적인 지표인 nitrosodimethylamine N-demethylase의 활성이 2배 정도인 것으로 관찰되었다. 본 실험에서도 4주령과 12주령의 자성 랫트에서 분리한 간의 microsomes에서 P450 2E1의 선택적인 기질인 *p*-nitrophenol hydroxylase 활성은 약 1.8배 차이가 있는 것으로 관찰되어 P450 2E1 활성은 자성 랫트에서도 연령에 따라 다르게 발현됨을 보였다. 그러나 복강주사된 3 g/kg 용량의 ethanol에 의해 4주령과 12주령의 랫트에서 동일한 정도로 간의 triglyceride 함량이 증가되어 연령에 따른 알콜성 지방간 생성에 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 위에서 시도된 화학물질을 전처리하여 P450 2E1 활성을 변화시킨 실험결과와 함께 급성적인 ethanol 투여에 의한 지방간 유발에 이 isozyme의 생체내 활성이 중요한 역할을 하지 않음을 강력하게 시사하고 있다.

Morimoto 등은 gastric tube로 한달간 ethanol 투여시 유발되는 lipid peroxidation과 지방간 생성에 allyl sulfide와 PIC가 억제효과를 나타내는 것을 관찰하고 이들 물질의 작용기전은 ethanol에 의한 P450 2E1 induction 억제효과와 관련된 것이라고 주장하였다.[22,23] 그러나 본 실험에서 P450 2E1 modulator들과 연령에 따른 P450 2E1 활성 변화는 급성적인 ethanol에 의한 지방간 생성에 변화를 유발시키지 못하였다. 이 결과들은 만성적인 ethanol 노출과 급성적인 ethanol 투여에 의한 지방간 생성은 각각 다른 발생기전에 기인할 가능성을 암시하고 있다.

한편 본 실험에 사용된 P450 2E1 modulator들 중에서 disulfiram은 P450 2E1 활성에 강력한 작용을 갖고 있을 뿐만아니라 aldehyde dehydrogenase 활성을 억제시키며 allyl sulfide와 pyrazine은 생체내에서 electrophilic metabolites의 무독화에 중요한 역할을 수행하는 glutathione S-transferase 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[24,27] 이 이외에도 본 연구에서 사용된 P450 2E1 modulator들이 ethanol 대사와 관련된 다른 enzymes이나 antioxidant systems에 주는 영향에 관해서는 아직도 충분히 연구되어 있지 않다. 또 랫트가

성체로 발달되는 단계에서는 여러 가지 중요한 생리적, 생화학적 변화가 수반되며 그 중에는 P450 2E1의 활성의 감소 이외에도 간의 재생능력이나 ADH의 활성과 ethanol 소실속도의 변화가 포함된다.[28-30] 따라서 본 실험에서 사용된 P450 2E1 modulator들의 다양한 효과에 의해 급성적인 ethanol 투여에 대한 반응은 랫트에서 일관성있게 나타나지 않는 것으로 보이며 급성적 알콜성 지방간의 생성기전 및 이와 관련된 YH 439를 비롯한 P450 2E1 modulator들의 작용에 대해서는 추후에 계속 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 부분적으로 신의약품개발연구센터(RCNDD, KOSEF)와 '94년도 과기처 특정연구개발사업 연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

Cytochrome P-450 2E1 (P450 2E1) 활성이 급성적인 ethanol 투여에 의해 유발되는 초기 단계의 지방간 생성에 미치는 영향을 자성 랫트에서 실험하였다. P450 2E1 활성을 변화시키기 위해 allyl sulfide (200 mg/kg, po), disulfiram (500 mg/kg, po)이나 YH 439 (250 mg/kg, po)를 inhibitor로 사용하던가 이 isozyme의 inducer로 pyrazine (200 mg/kg/day, ip)을 2일간 동물에게 투여하였다. 이들 P450 2E1 modulator 들은 사용된 용량에서 사염화탄소의 간독성과 이염화메탄에 의한 carboxyhemoglobin (COHb) 농도상승을 현저하게 변화시켰다. Ethanol (6 g/kg, po)은 간의 triglyceride 함량을 약 2배로 증가시켰으며 YH 439는 triglyceride 함량의 증가를 억제하여 정상수준을 유지시켰다. 그러나 YH 439를 제외한 P450 2E1 inhibitors와 inducer는 ethanol에 의한 triglyceride 함량증가에 영향을 주지 못하였다. 한편 미성숙한 4주령의 자성 랫트는 12주령의 성체와 비교시 hepatic microsomal aminopyrine N-demethylase 활성은 차이를 보이지 않았으나 P450 2E1의 선택적인 지표인 *p*-nitrophenol hydroxylase와 *p*-nitroanisole O-demethylase 활성은 유의성있게 높은 것으로 관찰되어 성장에 따라 이 isozyme에 의해 매개되는 대사활성은 감소함을 보였다. 그러나 복강으로 1회 투여된 ethanol (3 g/kg)에 의한 간의 triglyceride 함량증가에는 4주령과 12주령의 랫트 간에 연령에 따른 차이를 보이지 않았다. 본 실험결과는 급성적인 ethanol 투여에 의해 유도되는 지방간 생성에 P450 2E1은 중요한 역할을 하지 않음을 암시하고 있다.

참고문헌

1. Lieber, C.S.: Metabolic effects of ethanol on the liver and other digestive organs. *Clin. Gastroenterol.*, **10**, 315-342 (1981).
2. Abrams, M.A. and Cooper, C.: Quantitative analysis of metabolism of hepatic triglyceride in ethanol-treated rats. *Biochem. J.*, **156**, 33-46 (1976).
3. Morimoto, M., Hagbjork, A.L., Nanji, A.A., Ingelman-Sundberg, M., Lidros, K.O., Fu, P.C., Albano, E., and French, S.W.: Role of cytochrome P-450 2E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol*, **10**, 459-464 (1993).
4. Nanji, A.A., Lamb, R.G., Sadrzadeh, S.M.H., Dannenberg, A.J. and Waxman, D.J.: Changes in microsomal phospholipase and arachidonic acid in experimental alcoholic liver injury: Relationship to cytochrome P-450 2E1 induction and conjugated diene formation. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, **17**, 598-603 (1993).
5. Brady, J.F., Xiao, F., Wang, M.-H., Li, Y., Ning, S.M., Gapac, J.M. and Yang, C.S.: Effects of disulfiram on hepatic P-450IIE1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmocol.*, **108**, 366-373 (1991).
6. Brady, J.F., Li, D., Ishzaki, H. and Yang, C.S.: Effect of diallylsulfide on rat microsomal nitrosoamine and other monooxygenase activities. *Cancer Res.*, **48**, 5937-5940 (1988).
7. Choi, E.Y.: Effects of YH 439 on the expression of rat hepatic CYP 2E1, microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase. M.S. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (1994).
8. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M.: Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an

ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P450. *FEBS Lett.*, **183**, 265-270 (1985).

9. Kim, S.K. and Kim, Y.C.: Effect of a single administration of benzene, toluene or m-xylene on carboxyhaemoglobin elevation and metabolism of dichloromethane in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **16**, 437-444 (1996).
10. Thomas, 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 microsomes. *Biochemistry*, **26**, 2280-2289 (1987).
11. Reitman, S. and Frankel, S. K.: A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63 (1957).
12. Gerlach, U.: Sorbitol dehydrogenase. *In Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U. Ed.) Verlag Chemie, Weinheim, Vol. 3, pp. 112-117 (1983).
13. Rodkey, F.L., Hill, T.A., Pitts, L.L. and Robertson, R.F.: Spectrophotometric measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin in blood. *Clin. Chem.*, **25**, 1388-1393 (1979).
14. Van Handel, E. and Zilversmit, D.B.: Micromethod for the direct determination of serum triglyceride. *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 152-157 (1957).
15. Zlatis, A. and Zak, B.: Study of a new cholesterol reagent. *Anal. Biochem.*, **29**, 143-148 (1969).
16. Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55**, 416-421 (1953).
17. Shigematsu, H., Yamano, S. and Yoshimura, H.: NADH-dependent O-deethylation of *p*-nitrophenetole with rabbit liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 178-186 (1976).
18. Koop, D.R.: Hydroxylation of *p*-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 399-404 (1986).
19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
20. Luzio, N.R. and Hartman, A.D.: Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. *Fed. Proc.*, **26**, 1436-1442 (1967).
21. Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M.: Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450 IIE1). *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1313-1319 (1989).
22. Morimoto, M., Hagbjork, A.L., Wan, Y.Y., Fu, P.C., Clot, P., Albano, E., Ingelman-Sundberg, M. and French, S.W.: Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P-450 2E1 inhibitors. *Hepatology*, **21**, 1610-1617 (1995).
23. Morimoto, M., Reitz, R.C., Morin, R.J., Nguyen, K., Ingelman-Sundberg, M. and French, S.W.: CYP-2E1 inhibitors partially ameliorate the change in hepatic fatty acid composition induced in rats by chronic administration of ethanol and a high fat diet. *J. Nutr.*, **125**, 2953-2964 (1995).
24. Kwak, M.K.: Effect of allylsulfides on the expression of cytochrome P4502E1, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase. M.S. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (1993).
25. Kato, R. and Yamazoe, Y.: Sex-specific cytochrome P-450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol Lett.*, **64/65**, 661-667 (1992).
26. Hong, J.Y., Pan, J., Dong, Z., Ning, S.M. and Yang, C. S.: Regulation of N-nitrosodimethylamine demethylase in rat liver and kidney. *Cancer Res.*, **47**, 5948-5953 (1987).
27. Novak, R.F., Kim, S.G., Brooks, S.C., Primito, T., Salinas, F.M. and Novak, J.C.: Thiazole, pyridazine and pyrazine induction of glutathione S-transferase in rats. *Toxicologist*, **11**, 48 (1990).
28. 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 & Alcoholism*, **28**, 675-685 (1993).
29. Seitz, H.K., Xu, Y., Simanowski, U.A. and Osswald, B.: Effect of age and gender on in vivo ethanol elimination, hepatic alcohol dehydrogenase activity, and NAD^+ availability in F344 rats. *Res. Exp. Med.*, **192**, 205-212 (1992).
30. Gellert, J., Geisbuesch, B. and Teschke, R.: Impaired ethanol metabolism with advancing age in female rats: Studies on its mechanism. *Advances in the Biosciences*, **71**, 225-230 (1988).