

## 식이성 Tungstate가 사염화탄소 투여에 의한 흰쥐 간 손상에 미치는 영향

윤종국<sup>†</sup> · 박해숙 · 이상일\*

계명대학교 공중보건학과

\*계명전문대학 식품영양과

## Effect of Dietary Tungstate on the Liver Damage in CCl<sub>4</sub>-treated Rats

Chong-Guk Yoon<sup>†</sup>, Hae-Sook Park and Sang-II Lee\*

Dept. of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-037, Korea

### Abstract

To evaluate the role of xanthine oxidase in liver damage by CCl<sub>4</sub>, a group of rats were fed tungstate for a month, which suppressed the activities of xanthine oxidase in serum and liver. Control group of rats were fed standard diet without tungstate. Liver damage was induced both in tungstate fed and control groups by two intraperitoneal injections of CCl<sub>4</sub> at the level of 0.1ml/100g body weight at intervals of 24 hours. Increases in the levels of serum alanine aminotransferase by CCl<sub>4</sub> were significantly smaller in tungstate fed rats than in control rats. Concomitantly, histopathologic changes were less in tungstate fed rats than in control ones. In rats either treated with CCl<sub>4</sub> or not, hepatic type O xanthine oxidase activities were remarkably reduced by tungstate feeding. Hepatic aniline hydroxylase activities were higher in rats fed tungstate than control rats when animals were not treated with CCl<sub>4</sub>, but the enzyme activities were lower in tungstate fed rats than control when they were treated with CCl<sub>4</sub>. Neither tungstate feeding nor CCl<sub>4</sub> treatment caused any significant changes in hepatic glutathione contents, and activities of hepatic glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase. It is concluded that xanthine oxidase reaction augment CCl<sub>4</sub> induced liver damage via oxygen free radical system.

**Key words :** carbon tetrachloride, tungstate supplemented diet group, xanthine oxidase, aniline hydroxylase, glutathione, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase

### 서 론

최근 산업발전에 따른 산업장 유해물질이 근로자의 건강에 심각한 영향을 미치고 있는 실정이다. 이같은 산업장유해물질 중 xenobiotic의 일종인 사염화탄소 (CCl<sub>4</sub>)는 생체의 조직세포내에 활면내형질망 (smooth endoplasmic reticulum ; SER)의 복합산화기구 (mixed function oxidase system)에 의하여 free radical (-CCl<sub>3</sub>)로 전환되어 세포의 손상을 일으키는<sup>1,2)</sup> 간독소<sup>3)</sup>로서 식이조견에 따라 독성작용 발현에 차이가 나타난

다고 보고<sup>4~6)</sup>되어 왔다.

한편 xanthine oxidase (EC 1.3.2.1)는 생체내에서 purine체 대사뿐만 아니라 여러가지 heterocyclic compound 및 aldehyde류의 대사에도 관여하는 비특이적 인 효소이며 prosthetic group으로 iron과 molybdenum 및 NAD를 함유하고 있다<sup>7,8)</sup>. 그리고 실험동물이 virus<sup>9)</sup>, 세균<sup>10)</sup> 및 기생충<sup>11)</sup>에 감염시간 및 혈청 중 본 효소의 활성 증가가 보고되었다. 또한 본 효소는 전자수용체의 종류에 따라 NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase (type D) 와 O<sub>2</sub>-dependent oxidase (type O)로 나누고 있다<sup>12)</sup>. 특히 type O의 작용에 의하여 생성된 superoxide가 조직 손상을 야기<sup>13,14)</sup>시킨다고 한다. Tubaro 등<sup>10)</sup>은 이 효소

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

가 생체의 방어기전에 관여할 것이라고 하였으며, 최근 윤 등<sup>5)</sup>은 xanthine oxidase의 억제제인 allopurinol을 전처치하므로써 사염화탄소에 의한 간손상을 저하시킨다고 보고한바 있다.

Tungstate는 생체의 필수원소는 아니지만 인체에 흡수시 골조직에 침착될 수 있으나 뚜렷한 독작용은 나타내지 않으며<sup>15)</sup>, xanthine oxidase의 생합성을 억제시키는 금속원소로 알려져 있다<sup>16,17)</sup>.

이에 본 연구에서는 xanthine oxidase가 사염화탄소로 유발된 간손상에 어떠한 영향을 미치는지를 검토코자 tungstate첨가식으로 흰쥐를 성장시킨 다음, 사염화탄소를 투여하여 간무게변동, 간세포의 단백질 함량, 혈청 alanine aminotransferase 활성 및 간조직의 병리조직검사를 통한 간손상 정도와 xanthine oxidase의 활성, 약물대사효소의 활성 및 해독에 관여하는 효소들의 활성을 측정하여 tungstate를 첨가시키지 않은 식으로 성장시킨 표준식이군과 상호 비교 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 처치

동물은 체중이 130g 내외되는 의견상 건강한 Spra-

Table 1. Composition of experimental diet

(g/kg diet)

| Ingredients                           | Standard diet | Tungstate diet |
|---------------------------------------|---------------|----------------|
| Casein                                | 200           | 200            |
| Corn starch                           | 670           | 670            |
| Corn oil                              | 54            | 54             |
| Vitamin A & D mixture <sup>a)</sup>   | 10            | 10             |
| Vitamin E & K mixture <sup>b)</sup>   | 2             | 2              |
| Water soluble vitamin <sup>c)</sup>   | 3             | 3              |
| Vitamin B <sub>12</sub> <sup>d)</sup> | 1             | 1              |
| Salt mixture <sup>e)</sup>            | 40            | 39.28          |
| Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>       | -             | 0.72           |
| α-Celulose                            | 20            | 20             |
|                                       | 4190.9kcal    | 4190.9kcal     |

<sup>a)</sup> 51,000 unit of vitamin A and 5,100 unit of vitamin D dissolved in 100ml of corn oil

<sup>b)</sup> 5g of α-tocopherol and 0.2g of menadione dissolved in 200 ml of corn oil

<sup>c)</sup> Contained (mg) ; choline chloride 2,000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100

<sup>d)</sup> 5mg of vitamin B<sub>12</sub> dissolved in 500ml of distilled water

<sup>e)</sup> Contained (g) ; CaCO<sub>3</sub> 300, potassium phosphate dibasic 321.45 (standard diet) or 303.65 (tungstate diet), MgSO<sub>4</sub> 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl<sub>2</sub> 0.25, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.3, MnSO<sub>4</sub> 5, molybdic acid 0.2 (standard diet) or Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> 18 (tungstate diet)

gue-Dawley계의 숫흰쥐를 표준식으로 3일간 적응시킨 뒤 Table 1에 표시된 사료성분표에 따라 혼합하여 pellet로 만든 식이로 표준식이군과 tungstate첨가식이 군으로 각각 구분하여 약 1개월간 사용하여 체중이 약 200g내외되는 것을 실험에 사용하였다. 각 실험군은 군별로 분리수용하였으며 물은 1차 중류수로써 자유로이 섭취도록 하였다.

급성 간손상의 유도는 50% 사염화탄소 (olive oil과 동량 혼합액)를 체중 100g당 0.1ml씩 1일 간격으로 2회 복강내로 투여하여 야기시켰으며, 각 군의 대조군에는 동량의 olive oil을 동일한 방법으로 투여하였다. 실험동물은 처치전 12시간 동안 물만주고 금식시켰으며, 마지막 CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후에 ether 마취하에 복부정중선을 따라 개복한 다음 복부대동맥으로부터 체혈하고 생리식염수로 간을 관류하여 혈액을 제거한 후 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 간내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 그 일부를 10% formalin에 고정시켜 조직병리검사에 사용하였다.

### 호소시료의 조제

간조직 일정량을 절취하여 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가해 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 (20% w/v)을 700×g에서 10분, 10,000 ×g에서 20분간 원심분리한 다음 다시 105,000×g에서 1시간동안 초 원심분리하여 mitochondria분획, cytosol분획 및 microsome분획을 얻었다. Cytosol분획은 xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 활성 측정의 효소원으로, microsome분획은 aniline hydroxylase 활성 측정 효소원으로, mitochondria분획은 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 실온에서 응고 시킨 후, 원심분리하여 혈청을 얻고 실험에 사용하였다.

이상의 모든 조작은 2~4°C에서 행하였다.

### 효소의 활성 측정

Aniline hydroxylase의 활성 측정은 기질인 aniline으로부터 생성된 p-aminophenol을 비색정량하는 Bidlack와 Lowery<sup>18)</sup>의 방법에 준하였으며, catalase의 활성은 기질인 hydrogen peroxide가 분해되는 정도를 측정하는 Aebi<sup>19)</sup>의 방법에 준하였고, glutathione peroxidase의 활성은 효소에 의해 생성된 산화형 glutathione을 glutathione reductase의 존재하에서 NADPH로 환

원 시킬 때 소보되는 NADPH를 측정하는 Paglia와 Valentine<sup>20</sup>의 방법으로, glutathione S-transferase의 활성을 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione이 반응하여 생성된 thioether (conjugate)의 양을 측정하는 Habig 등<sup>21</sup>의 방법으로, superoxide dismutase의 활성을 pyrogallol의 자동산화 억제도를 측정하는 Roth와 Gilbert<sup>22</sup>의 방법으로 측정하였으며 활성단위는 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는 것을 1 unit로 하여 단백질 1mg당으로 나타내었다. Xanthine oxidase의 활성을 기질인 xanthine의 산화에 의해 생성된 uric의 함량을 측정하는 Stirpe와 Della<sup>23</sup> 및 Yoon<sup>24</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 이때 NAD<sup>+</sup>를 함유치 않은 반응액으로 측정한 것을 type O의 활성치료, NAD<sup>+</sup>를 함유시킨 반응액으로 측정한 것을 총활성 (type O + type D)으로 하였다. 한편 혈청중 alanine aminotransferase의 활성을 Reitman과 Frankel의 방법<sup>25</sup>에 따라 조제된 kit시약을 사용하여 측정하였다.

#### 간조직 단백질 및 glutathione함량측정

단백질함량은 Lowry 등<sup>26</sup>의 방법에 의하였으며 glutathione함량은 Ellman의 방법<sup>27</sup>에 준하였다.

#### 간조직의 병리조작검사

10% formalin에 고정된 조직을 paraffin에 포매하여 4μm의 두께로 박절하고 hematoxylin-eosin 염색<sup>28</sup> 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 간 및 혈청중 xanthine oxidase의 활성변동

표준식이 및 tungstate첨가식이로 성장한 흰쥐의 혈청 및 간조직의 xanthine oxidase활성변동을 Table 2에 나타내었다. 본 논문에서 data로는 제시하지 않았으나

Table 3. Effect of CCl<sub>4</sub> treatment on the liver weights, protein contents and serum alanine aminotransferase levels in rats fed standard or tungstate

| Parameters                                   | Groups     | Standard diet group |                  | Tungstate diet group |                  |
|--|------------|---------------------|------------------|----------------------|------------------|
|  |            | Control             | CCl <sub>4</sub> | Control              | CCl <sub>4</sub> |
| Liver wt / Body wt (%)                       |            | 3.41±0.10           | 4.96±0.14**      | 3.32±0.12            | 4.29±0.06**      |
| Hepatic protein <sup>a)</sup>                | Cytosolic  | 125.10±6.19         | 103.73±2.95**    | 121.86±5.70          | 113.33±2.69      |
|  | Microsomal | 12.00±3.09          | 8.73±1.70        | 11.43±1.25           | 9.98±1.11        |
| Serum alanine aminotransferase <sup>b)</sup> |            | 19.90±0.44          | 210.60±17.55***  | 22.23±0.49           | 77.22±9.17**     |

Each value is the mean±S.E. of 6 rats

\*\*Significantly different from the control group ( $p<0.01$ )

<sup>a)</sup>mg/g wet liver    <sup>b)</sup>Karmen unit/ml

타 연구자들의 보고<sup>15</sup>와 마찬가지로 식이설크릴과 사료효율 및 체중증가량은 표준식이군과 tungstate첨가식이군 사이에 별다른 차이가 없었다. 이러한 조건下에서, 간조직의 xanthine oxidase활성을 tungstate첨가식이군이 표준식이군보다 약 79%의 유의한 ( $p<0.001$ ) 감소를 나타내었으며, 혈청중 본 효소의 활성 역시 tungstate첨가식이군이 표준식이군보다 약 94.6%의 현저한 감소를 보였다. 이러한 실험성적으로 보아 tungstate첨가식이군이 xanthine oxidase결핍 실험모델임을 확인할 수가 있다.

식이성 tungstate가 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상에 미치는 영향

간손상의 지표<sup>9</sup>로서 체중당 간무게, 간세포의 단백질 및 혈청 alanine aminotransferase활성을 측정하여 나타낸 것이 Table 3이다. Tungstate식이군과 표준식이군간에는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 CCl<sub>4</sub>를 투여하였을 때, 대조군에 대한 간무게 증가율은 tungstate식이군에 있어서는 약 29% ( $p<0.01$ ), 표준식이군에서는 약 45%의 유의한 ( $p<0.01$ ) 증가를 보였으며 혈청 alanine aminotransferase활성치는 tungstate식이군에서는 약 3.5배, 표준식이군에서는 약 10배의 현저한 증가를 보였다. 그리고 CCl<sub>4</sub>투여로 인한 대조군에 대한 간세포의 cytosolic protein함량감소율은 표

Table 2. Activities of total xanthine oxidase in serum and liver of rats fed standard or tungstate diet specimens

| Groups         | Liver <sup>b)</sup> | Serum <sup>b)</sup> |
|----------------|---------------------|---------------------|
| Standard diet  | 1.52±0.21           | 19.50±2.93          |
| Tungstate diet | 0.32±0.05***        | 1.21±0.12***        |

Each value is the mean±S.E. of 6 rats

<sup>b)</sup>Formed uric acid nmole/min/mg protein

<sup>a)</sup>Formed uric acid μmole/min/L of serum

\*\*\* Significantly different from the standard diet group ( $p<0.001$ )

준식이군에서는 약 17%정도의 유의한 ( $p < 0.01$ ) 감소를 보였으나, tungstate식이군에서는 별다른 차이를 볼 수 없었으며, 간세포의 microsomal protein 함량 또한 tungstate식이군에는 대조군과 실험군간에 별다른 차이를 볼 수 없었으나 표준식이군에서는 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다.

한편 병리조직검사소견에 있어서 표준식이군에 olive oil만 주사한 간조직은 간소엽내 hepatic cell cord를 포함한 간세포들이 잘 보존되어 있어 특이한 변화는 없었으며, tungstate첨가식이로 성장시킨 혼쥐에서도 표준식이군과 별다른 차이가 없었다. 그러나 표준식이군

에 CCl<sub>4</sub>를 투여한 간조직은 중심정맥주위에 vascular degeneration된 세포들과 파괴된 세포들이 혼재되어 나타났으며 중심대에 있는 세포들은 지방소적으로 생작되는 microvacular granule들이 다소 관찰되었다. 한편 tungstate첨가식이군에 CCl<sub>4</sub>를 투여한 간조직에서는 중심정맥 둘레에 간세포들의 변성이 표준식이로 성장한 혼쥐에 CCl<sub>4</sub>를 주사한 경우에 비해서 호전되는 양상을 보였다. 또한 중심대에 세포들도 지방소적이 현저히 감소됨을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 1).

이상의 생화학적 및 병리 조직학적인 성적들을 종합해 볼때 본 실험에서 투여되어진 tungstate의 함량은

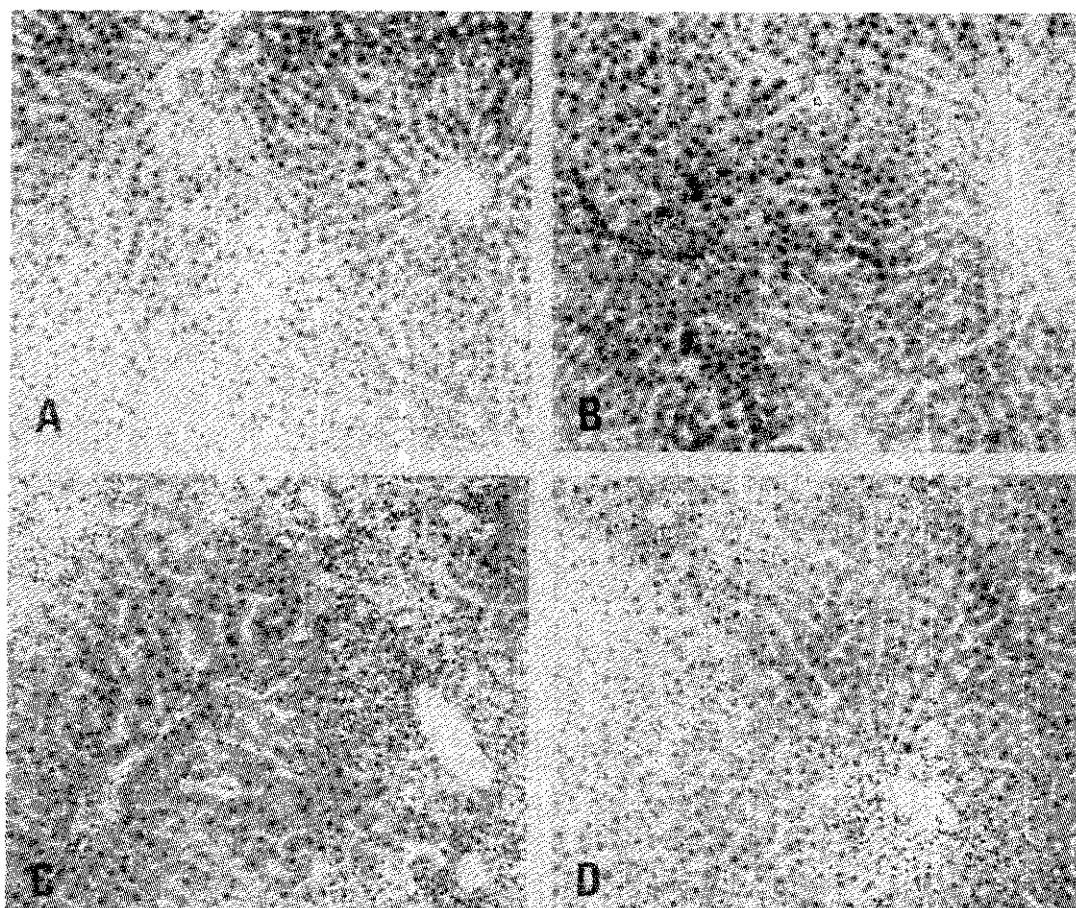


Fig. 1. Light microscopic findings on the liver of carbon tetrachloride treated rats fed a tungstate supplemented or standard diet(Hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ).

- A. Standard diet group ; The appearance of liver lobule is normal.
- B. Tungstate supplemented diet group ; Hepatic structure is similar to control group.
- C. Standard diet group treated with carbon tetrachloride ; Centrolobular necrosis with vacuolation are seen and severe inflammatory cells infiltration is evident.
- D. Tungstate supplemented diet group treated with carbon tetrachloride ; Centrolobular necrosis are diminished compared with that of C, but mild inflammatory cells are also remain.

현취에 별다른 독작용을 유발하지 않을 것으로 사료되어지며, 뿐만 아니라 CCl<sub>4</sub>를 투여하였을 때에 간손상의 정도가 tungstate식이군이 표준식이군 보다 경미하게 나타남을 알 수 있었다.

#### 간조직중 aniline hydroxylase 및 xanthine oxidase (type O) 활성변동

Tungstate첨가식이로 성장시킨 실험동물에서 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상의 정도가 경미하게 나타나는 것이 어떤 기전에 의한 것인지를 검토할 목적으로 CCl<sub>4</sub>의 활성화에 관여하는 것으로 알려져있는 micosomal cytochrome P450의 일종인 aniline hydroxylase의 활성<sup>29,30)</sup>과 oxygen free radical 생성과 관련된 xanthine oxidase의 type O 활성<sup>17)</sup>을 tungstate 첨가식이군과 표준식이군에서 함께 측정하여 Table 4에 나타내었다.

Tungstate첨가식이군은 표준식이군 보다 type O의 xanthine oxidase 활성이 약 83%정도 현저한 감소를 보였으며, CCl<sub>4</sub>를 투여한 경우에는 두 군 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다. 또한 CCl<sub>4</sub>를 투여한 실험군에 있어서는 tungstate첨가식이군이 표준식이군

보다 약 85%정도의 현저한 감소를 보였다.

한편 aniline hydroxylase활성에 있어서는 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 약 23%의 유의한 ( $p < 0.01$ ) 증가를 보였으며, CCl<sub>4</sub>투여로 인한 본 효소의 활성 감소율은 tungstate첨가식이군이 표준식이군에 비해서 높게 나타났다. 따라서 실험동물에 CCl<sub>4</sub>투여 시 그 활성이 감소된다는 간 aniline hydroxylase활성<sup>5,29,30)</sup>이 표준식이군 보다 tungstate첨가식이군에서 높게 나타남과 동시에 CCl<sub>4</sub>투여로 인한 본 효소의 활성감소율 역시 tungstate첨가식이군이 표준식이군에 비하여 높게 나타남은 CCl<sub>4</sub>로부터 trichloromethyl (-CCl<sub>3</sub>) free radical 생성율이 표준식이군 보다 tungstate첨가식이군이 높게 나타남을 암시해주고 있다. 그러나 tungstate첨가식이군에 있어서 표준식이군 보다 trichloromethyl free radical 생성율이 높게 나타나는데도 불구하고 본 실험에서 간손상이 표준식이군 보다 낮게 나타나는 것은 조직의 손상이 trichloromethyl radical과 같은 electrophilic compound뿐만 아니라 oxygen free radical들이 상당한 영향을 미치는 것<sup>13,14)</sup>으로 알려지고 있어, xanthine oxidase의 활성이 현저히 억제된

Table 4. Effect of dietary tungstate on the hepatic xanthine oxidase (type O) and aniline hydroxylase activities in CCl<sub>4</sub>-treated rats

| Groups                            | Standard diet group |                              | Tungstate supplemented diet group |                                |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|                                   | Control             | CCl <sub>4</sub> -treated    | Control                           | CCl <sub>4</sub> -treated      |
| Enzyme activities                 |                     |                              |                                   |                                |
| Xanthine oxidase <sup>a)</sup>    | 0.400±0.060         | 0.790±0.089*** <sup>b)</sup> | 0.068±0.016*** <sup>a)</sup>      | 0.120±0.024*** <sup>b,c)</sup> |
| Aniline hydroxylase <sup>a)</sup> | 26.080±0.550        | 3.210±0.200*** <sup>b)</sup> | 31.780±1.590*** <sup>a)</sup>     | 0.420±0.920*** <sup>b,c)</sup> |

Each value is the mean±S.E. of 6 rats

<sup>a</sup> Significantly different from the standard diet group

<sup>b</sup> Significantly different from the control group

<sup>c</sup> Significantly different from the standard diet group treated with CCl<sub>4</sub>

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

<sup>a)</sup> Formed uric acid nmoles/min/mg protein <sup>b)</sup> Formed p-aminophenol nmoles/hr/mg protein

Table 5. Effect of CCl<sub>4</sub> treatment on the contents of glutathione and the activities of glutathione S-transferase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in liver of rats fed tungstate supplemented diet or standard diet

| Groups                                  | Standard diet group |                             | Tungstate supplemented diet group |                             |
|---|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
|   | Control             | CCl <sub>4</sub> -treatment | Control                           | CCl <sub>4</sub> -treatment |
| Enzyme activities                       |                     |                             |                                   |                             |
| Glutathione contents <sup>a)</sup>      | 5.55±0.50           | 7.30±0.90                   | 5.72±0.46                         | 6.69±0.83                   |
| Glutathione S-transferase <sup>a)</sup> | 750.10±37.04        | 578.75±92.60                | 842.66±92.60                      | 773.21±101.86               |
| Glutathione peroxidase <sup>a)</sup>    | 16.31±1.67          | 20.52±1.16                  | 18.09±1.50                        | 17.70±0.99                  |
| Superoxide dismutase <sup>a)</sup>      | 20.92±3.07          | 15.78±5.63                  | 28.75±3.26                        | 23.56±4.59                  |
| Catalase <sup>a)</sup>                  | 190.60±6.56         | 129.79±11.64**              | 179.94±5.61                       | 162.09±13.34                |

Each value is the mean±S.E. of 6 rats

<sup>a</sup> Significantly different from the control group ( $p < 0.01$ )

<sup>a)</sup> μmoles/g of tissue, <sup>b)</sup> Formed thioether nmoles/min/mg protein <sup>a)</sup> Decreased NADPH μmoles/min/mg protein,

<sup>a)</sup> Unit/mg protein, <sup>b)</sup> Decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nmoles/min/mg protein

tungstate 첨가식이군에서는 표준식이군에서와는 달리 cytochrome P450에 의해 생성된 trichloromethyl radical로 인한 간조직 손상만 나타났을 뿐, oxygen free radical<sup>[13,14]</sup>로 인한 조직의 손상은 별로 가세되지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

#### 간조직중 free radical scavenging 효소들의 활성 변동 및 glutathione의 함량변동

일반적으로 CCl<sub>4</sub>에 의한 간독성은 free radical 생성 계와 더불어 해독계의 활성변동에 의해서도 상당한 영향을 받는 것으로 알려져 있다<sup>[3,31]</sup>. 그러므로 본 실험조건에서 oxygen free radical 및 ·CCl<sub>3</sub>에 의해 생성된 lipid peroxide 뿐만 아니라 oxygen free radical 자체도 무독화 시키는 간조직 glutathione과 포함효소인 glutathione S-transferase 그리고 glutathione peroxidase 활성<sup>[32,33]</sup> 및 superoxide dismutase와 catalase 활성<sup>[34,35]</sup>을 측정하여 상호 비교한 성적은 Table 5이다.

간조직 중 glutathione 함량 및 이의 포함효소인 glutathione S-transferase 활성과 glutathione peroxidase, superoxide dismutase 및 catalase 활성에 있어서 tungstate 첨가식이군과 표준식이군의 각 대조군간에 통계학적 차이를 볼 수 없었다. 또한 CCl<sub>4</sub>투여시 간조직 중 catalase 활성치는 대조군에 비하여 약 30% 감소되었으나 이의 glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 활성에 있어서는 tungstate 첨가식이군과 표준식이군간에 역시 통계학적 차이를 볼 수 없었다. 그러므로 식이성 tungstate에 의한 CCl<sub>4</sub>의 간 독성작용 감소현상은 free radical 해독계와도 무관한 것으로 생각된다.

이상 실험결과와 문현상의 지견을 종합하여 볼 때 식이성 tungstate에 의해 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상의 감소되는 것은 tungstate가 xanthine oxidase의 활성을 저하시켜, 이로 인하여 oxygen free radical 생성율이 감소됨으로서 나타난 결과로 생각된다.

#### 요 약

혼취를 tungstate 첨가식이 및 tungstate를 첨가시키지 않은 표준식이로 약 1개월간 성장시킨 후 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성을 측정한 결과, xanthine oxidase 활성이 표준식이군 보다 tungstate 첨가식이군이 현저히 감소됨으로서 tungstate 첨가식이군이 xanthine oxidase 결핍 실험동물모델로 확인되었다. 이때 CCl<sub>4</sub> 투여 (0.1ml/100g body wt., 1일 간격 두번)로 인한 간부

계 및 혈청 alanine aminotransferase 활성 증가율과 간 세포 중 단백질 감소율은 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 낮게 나타났다. 또한 병리조직검사 소견에서도 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 간손상의 정도가 낮게 나타났다. 따라서 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 간손상이 경미하게 나타남을 확인할 수 있었다. 한편 간조직 중 xanthine oxidase의 type O 활성은 대조군 및 CCl<sub>4</sub> 투여군 모두 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 현저히 감소되었다. 그리고 간 microsomal aniline hydroxylase 활성은 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 높게 나타났으며, CCl<sub>4</sub> 투여로 인한 본 효소의 감소율 역시 tungstate 첨가식이군이 표준식이군 보다 높게 관찰되었다. 또한 간조직 중 glutathione 함량과 이의 포함효소인 glutathione S-transferase 활성과 catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 활성변동에 있어서는 대조군 및 CCl<sub>4</sub> 투여군 모두 표준식이군과 tungstate 첨가식이군간에 대체적으로 통계적인 차이를 볼 수 없었다. 이상 실험결과로 보아 식이성 tungstate에 의해 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간손상의 감소현상은 xanthine oxidase의 활성이 tungstate에 의해 억제되므로써 이로 인하여 oxygen free radical의 생성율이 저하된 때문에 나타난 결과로 생각된다.

#### 문 헌

1. Recknagel, R. O. and Glende, E. A. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity : An example of lethal cleavage. *C. R. C. Crit. Rev. Toxicol.*, 2, 263 (1973)
2. Recknagel, R. O., Glende, E. A., Jr. and Hruszkewycz, A. M. : New data supporting an obligatory role for lipid peroxidation in CCl<sub>4</sub>-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose-6-phosphatase. In "Biological reactive intermediates : Formation, toxicity and inactivation" Jollow, D. J., Kocsis, J. J., Snyder, R. and Vainio, H.(eds.), Plenum Press, New York, p.417 (1977)
3. 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 (1983)
4. Campbell, R. M. and Kosterlitz, H. W. : The effects of short term changes in dietary proteins on the response of the liver to carbon tetrachloride. *Brit. J. Exp. Path.*, 29, 149 (1948)
5. 윤종국, 이상일, 신중규 : 식이성 단백질함량에 따른 혼취에 사염화탄소 투여가 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, 20, 527 (1991)
6. 윤종국, 강희양, 이상일 : 저단백식이로 성장한 혼취에 사염화탄소 투여가 aniline hydroxylase 활성에 미치는 영향. *연구논집(계명대학교 기초과학 연구소)*,

- 7, 125 (1988)
7. Ho, C. Y. and Clifford, A. J. : Digestion and absorption of bovine milk xanthine oxidase and its role as an aldehyde oxidase. *J. Nutr.*, **106**, 1600 (1976)
  8. Massey, V. : Iron-sulfur flavoprotein hydroxylases. In "Iron-sulfur proteins" Lovenberg, W.(ed.), Academic Press, New York, Vol.1, p.301 (1973)
  9. Ziegler, D. W., Hutchinson, H. D. and Kissling, R. E. : Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice. *Infection and Immunity*, **3**, 237 (1971)
  10. Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Gorce, C. : Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Arzneim-Forsch.(Drug Res.)*, **26**, 2185 (1976)
  11. Crossby, P. F., Matos, M. L. and Rivera-Collazo, E. : Liver xanthine oxidase activity of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, **55**, 673 (1969)
  12. Waud, W. R. and Rajagopalan, K. V. : Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-dependent(type D) and O<sub>2</sub>-dependent forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 354 (1976)
  13. Bernard, M. B., Kipnes, R. S. and Curnutt, J. T. : Biological defense mechanism. *J. Clin. Invest.*, **52**, 741 (1973)
  14. Granger, D. V., Rutili, G. and McCord, J. M. : Superoxide radicals in teline intestinal ischemia. *Gastroen.*, **81**, 22 (1981)
  15. Hammond, P. B. and Belies, R. P. : Metals. In "Toxicology" Doull, J., Klassen, C. D. and Amdur, M. O.(eds.), 2nd ed., Macmillan Publishing Co., New York, p.409 (1980)
  16. Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V. and Cohen, H. J. : Molecular basis of the biological function of molybdenum : Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J. Biol. Chem.*, **249**, 859 (1974)
  17. Owen, E. C. and Proudfoot, R. : The effect of tungstate ingestion on xanthine oxidase in milk and liver. *Br. J. Nutr.*, **22**, 331 (1968)
  18. Bidlack, W. R. and Lowery, G. L. : Multiple drug metabolism : p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 311 (1982)
  19. aebi, H. : Catalase. In "Methods of enzymatic Analysis" Bergmeyer, H. U.(ed.), Academic Press, New York, Vol. 2, p.673 (1974)
  20. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158 (1967)
  21. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferases : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974)
  22. Roth, E. F. and Gilbert, H. S. : The pyrogallol assay for superoxide dismutase : Absence of a glutathione artifact. *Anal. Biochem.*, **137**, 50 (1984)
  23. Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855 (1969)
  24. Yoon, C. G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal( Keimyung Junior College )*, **2**, 295 (1984)
  25. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957)
  26. 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 (1951)
  27. Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
  28. Degertekin, H., Akdamar, K., Yates, R., Chen, I., Ertan, A. and Vaupel, R. : Light and electron microscopic studies of diet induced hepatic changes in mice. *Acta Anat.*, **125**, 174 (1986)
  29. Hangen, D. A. and Coon, M. J. : Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β-naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7929 (1976)
  30. Noguchi, T., Fong, K. L., Lai, E. K. and Alexander, S. S. : Specificity of phenobarbital induced cytochrome P-450 for metabolism of CCl<sub>4</sub> to the trichloromethyl radical. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 615 (1982)
  31. Leibovitz, B. E. and Siegel, B. V. : Aspects of free radical reaction in biological system. *Aging J. Gerontol.*, **35**, 45 (1980)
  32. Boyland, E. and Chasseud, L. F. : The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **32**, 173 (1969)
  33. Jakoby, W. B. : The glutathione S-transferase : A group of multifunctional detoxication proteins. *Adv. Enzymol.*, **46**, 383 (1978)
  34. Halliwell, B. : Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. : Solutions to the problem of living with oxygen. *New Phytol.*, **73**, 1075 (1974)
  35. Tappel, A. L. : Protection against free radical lipid peroxidation reaction. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **97**, 111 (1978)

(1993년 7월 6일 접수)