

Ascorbic acid 가 에탄올 대사효소에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 약리학교실

김 용 식

= Abstract =

Effect of Ascorbic Acid on the Activities of Ethanol Metabolizing Enzymes

Yong Sik Kim

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Effect of ascorbic acid on various hepatic ethanol metabolizing enzymes including alcohol dehydrogenase(ADH), the microsomal ethanol oxidizing system(MEOS), and catalase was quantitatively evaluated in liver microsomal and cytosolic preparation from Sprague-Dowley rats.

In present study, ADH activities were no changed significantly by ascorbic acid.

The MEOS activity, dependent on NADPH and O₂, was affected by azide (inhibitor of catalase) or exogenous catalase.

In the presence of ascorbic acid, ethanol oxidation by rat liver microsomal preparation reacted with NADPH-generating system was increased by up to 22.5%, but decreased when liver microsome was reacted with H₂O₂ generated by xanthine and xanthine oxidase.

Increase in the activity of the MEOS in the presence of ascorbic acid was greater in liver microsomal preparation pretreated with azide.

Also ascorbic acid oxidized ethanol nonenzymatically.

This ethanol oxidation induced by ascorbic acid was inhibited by ·OH radical scavengers (thiourea, sodium benzoate), but was not much affected by superoxide dismutase.

From these results it was suggested that ascorbic acid could interact directly with the MEOS, then promote the oxidation of ethanol.

And, to some extent, ·OH-radicals or other radicals generated during the spontaneous autooxidation of ascorbic acid may be responsible for the production of acetaldehyde from ethanol.

서 론

일반적으로 Alcohol dehydrogenase(ADH)가 체내에서 에탄올 산화속도를 조절하는 주요소로 작용하리라 믿어지고 있으나(Hawins and Kalant, 1972), 잘 알려진 ADH 억제제에 의해 에탄올대사가 어느 정도 이상 억제되지 않으며, 만성 알코올 섭취에서 에탄올의

대사가 증가되는데 비해 ADH 활성도의 증가는 현저하지 못하거나 반대로 억제된다는 보고(Greenberger et al, 1965) 및 인체 또는 실험동물에서 에탄올의 장기투여로 간세포의 smooth endoplasmic reticulum의 증식을 볼 수 있고 에탄올의 산화가 증가됨을 보이며, 또한 간 microsomal mixed function oxidase(MFO)를 유도할 수 있는 여러 약물에 의해서도 에탄올대사가 촉진된다는 결과들은 간세포 microsome도 알코올

대사에 관여함을 보이는 것이다(Conney, 1967; Bleich and Boro, 1978).

간조직에서 알코올이 알데하이드로 산화되는 반응경로는 *in vitro*에서는 적어도 다음의 3가지 경로에 의해, 즉 ADH(Teschke et al, 1975), H₂O₂ 및 Catalase를 통한 경로(Thurman et al, 1972)와 NADPH와 Cytochrome P 450을 함유하는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)(Lieber and Decarti, 1968, 1970)에 의해서 에탄올의 대사가 이루어진다고 보고되고 있다.

한편 ascorbic acid는 예방적으로 또는 치료 목적으로도 다량 사용이 되고 있는 약물로 최근 여러 보고에서 보듯, guinea pig에서 ascorbic acid의 결핍은 간 MFO활성도 및 Cytochrome P 450량의 감소를 일으키며, ascorbic acid의 투여로 MFO활성도와 Cytochrome P 450량이 원래 수준으로 회복될 수 있다는 결과(Zannoni et al, 1972)와 microsome내 전자전달계에 일부로 알려진 Cytochrome P 450-reductase 활성도가 ascorbic acid 의존성이라는 보고들은 ascorbic acid가 Cytochrome P 450의 활성형의 assembly에 영향을 미치는 것을 시사하는 것으로 ascorbic acid가 약물대사에 관여됨을 보이는 것이다(Sato and Zannoni, 1976; Peterson et al., 1983).

백서에서 급성 또는 만성에탄올 투여로 간 microsome에서 ascorbic acid의 생합성이 증가되며 그 결과 소변과 조직내 ascorbic acid의 농도가 높아진다는 보고(Hsu and Hsieh, 1982)와 정상인에서 ascorbic acid를 2주이상 투여한 결과 백혈구의 ascorbic acid 농도가 상승하는 한편 혈중 에탄올의 제거율과 ADH활성도도 증가한다는 보고(Krasner et al, 1974)들은 ascorbic acid가 알코올대사에도 영향을 미치는 결과로 해석될 수 있다.

그러므로 본 실험에서는 MFO의 활성형 및 약물대사에 관여하리라 믿어지는 ascorbic acid가 microsome을 통한 에탄올의 대사가 어떠한 영향을 미치는가 알아 보기 위하여 *in vitro*에서 ascorbic acid 처리로 인해 MEOS활성도의 변화 유무를 관찰했으며 함께 다른 알코올대사효소 활성도에 대한 효과도 검토하였다.

실험 방법

실험동물로는 200~250 gram의 음성 Sprague-Dawley 백서를 실험전 16시간 동안 굶긴 후 사용하였다.

실험동물은 두부에 타격을 가하여 치사시키고, 즉시 복강을 열어 문맥정맥을 통하여 냉각된 0.15 M KCl, 1mM EDTA, 0.05 M Tris-HCl(pH 7.4) 용액으로 관류시킨 후 간을 절제하여 무게를 측정하고, 상기의 용액 3배량을 첨가한 후 조직을 잘게 썰어 Teflon homogenizer로 분쇄하였다.

간 분쇄조직은 초고속원심분리기(Ultracentrifuge: Beckman L 8-80 R)를 사용하여 10,000×g, 30분간 원심침전시켜 상층액만을 취한 후 다시 105,000×g, 60분동안 원심침전시켜 상층액과 침전물의 두 분획으로 분리하였다.

얻어진 상층액을 cytosol 분획으로 사용하여 ADH활성도 측정에 사용하였고, 침전물은 0.15 M KCl, 0.05 M Tris-HCl(pH 7.4) 용액으로 세척하여 다시 105,000×g, 60분간 원심침전시켜 얻어진 microsome 분획을 0.15 M KCl 용액에 단백질이 8~10 mg/ml 되게 부유하여 실험에 사용하였다.

상기의 조작은 4°C 이하에서 수행했으며 단백질의 측정에는 Lowry 등(1951)의 방법을 사용하였다.

에탄올 대사효소로서는 ADH활성도, MEOS활성도 및 catalase에 의해 일어나는 과산화반응에 의한 에탄올의 산화를 측정하였다.

ADH활성도 측정 : ADH활성의 측정은 ADH의 촉매작용으로 에탄올이 아세트알데하이드로 산화됨에 따라서 이 반응의 조효소로 참여되는 NAD⁺가 NADH로 환원됨을 340 nm에서 측정하여 흡광도의 변화정도를 얻어 계산하였다(Bonnichsen and Brink, 1955).

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 5~100 mM 에탄올에 105,000×g 원심상층액 일정량(0.4~0.6 mg. protein)을 첨가하여 37°C에서 3분간 견차치한 후 1 mM 되게 NAD⁺를 반응액에 가하였고 ascorbic acid 첨가시에는 ascorbic acid 1 mM을 NAD⁺로 반응시키기 바로 전에 첨가하여 총 반응액이 3 ml 되게 하여 3분동안 변화된 흡광도를 UV spectrophotometer(Beckman DU-8)를 이용하여 측정하였다.

Microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)활성도 측정 : MEOS활성도의 측정은 Lieber and DeCarli(1970)와 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

180 mM potassium phosphate(pH 7.4)용액에 녹인 15 mM semicarbazide 0.6 ml를 넣은 central well을 포함한 50 ml 용기내에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, NADPH-generating system(10 mM Glucose-6-phosphate, 7 units Glucose-6-phosphate dehydrogenase,

0.4 mM NADP⁺) 및 microsome 적당량을 첨가하여 최종 반응액을 3 ml 로 하여 측정하였다.

반응액내 에탄올의 농도는 50 mM 로 하였고 Glucose-6-phosphate 와 Glucose-6-phosphate dehydrogenase 를 첨가한 후 고무마개로 밀폐시켜 반응을 시작하였으며, 10분 후 주사기를 사용하여 70% TCA 0.5 ml 를 반응액에 주입하여 반응을 끝냈다.

반응을 끝낸 후 생성된 아세트알데하이드가 용기내에서 충분히 확산되도록 24시간 실온에서 방치한 후 central well 내 용액을 증류수로 3 ml 되게 희석하여 aldehyde-semicarbazone complex 의 흡광도를 224nm 에서 측정하여 계산에 사용하였다.

한편 microsome 분획에 혼합되어 존재하는 catalase 에 의한 에탄올의 산화정도를 알아보기 위해서 NADPH-generating system 대신 0.4 mM xanthine 과 0.02 units/ml xanthine oxidase 를 사용하여 생성되는 H₂O₂ 를 이용한 catalase 의 과산화반응을 측정하였다.

Ascorbic acid 에 의해서 microsome 의 에탄올 산화가 변화되는 양상을 관찰하기 위해서는 ascorbic acid 1 mM 을 동일한 반응액에 NADPH-generating 또는 H₂O₂-generating system 으로 반응을 시작하기 바로 전에 첨가하여 같은 방법으로 에탄올의 산화정도를 측정하였다.

한편 에탄올이 ascorbic acid 에 의해 비효소적인 산화가 일어나는 것으로 잘 알려진 바(Cohen, 1974) microsome 을 포함하지 않은 동일한 반응액에서 에탄올 50 mM 과 ascorbic acid 1 mM 을 첨가하여 비효소적인 에탄올의 산화를 측정하여 이 효과를 ascorbic acid 1 mM 과 microsome 이 동시에 작용하는 반응액에서의 에탄올 산화결과에서 제거하여 비교하였다.

실 험 결 과

1) Ascorbic acid 가 ADH 활성도에 미치는 영향

ADH 활성도는 반응액내 에탄올의 농도가 5~100 mM 의 전 범위에서 ascorbic acid 1 mM 첨가 유무에 관계없이 같은 수준을 유지하였다(Table 1).

한편 ADH 의 최적 pH 10 보다 높은 것으로 알려져 있으므로, 에탄올 50 mM 을 첨가하여 pH 9.6 에서 측정한 결과에서도 대조군 8.37±0.21 nmoles acetaldehyde/min/mg. protein, ascorbic acid 1 mM 존재 시 7.97±0.14 nmoles acetaldehyde/min/mg protein 으로 ascorbic acid 가 ADH 활성도에 영향을 미치지 않음을 보였다.

Table 1. Effect of Ascorbic acid on the activity of Alcohol dehydrogenase(ADH)

Ethanol (mM)	ADH activity(nmoles Acetaldehyde produced/min/mg protein)	
	Control	1mM Ascorbic acid
5	1.71±0.16	1.52±0.11
10	3.59±0.29	3.25±0.14
25	4.46±0.40	4.43±0.26
50	5.02±0.22	4.67±0.19
100	4.98±0.21	4.27±0.11

Values are mean±S.E. from 5-8 experiments.

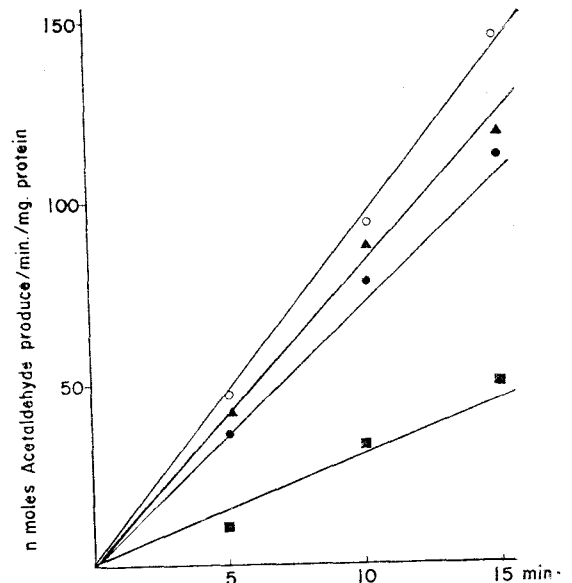


Fig. 1. Production of acetaldehyde from ethanol by rat liver microsomal preparation with NADPH-generating system or H₂O₂ generating system. Microsomes were preincubated with ethanol for 3 minutes at 37°C; the reaction was then started by addition of NADPH generating system consisted of 0.4 mM NADP⁺, 10 mM Glucose-6-phosphate, 7 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase or H₂O₂-generating system consisted of 0.4 mM xanthine and 0.02 units/ml of xanthine oxidase. Termination of the reaction and the oxidation of ethanol was assayed as described in Methods. NADPH-generating system(○), NADPH-generating System+1mM NaNO₃(●), H₂O₂-generating System(▲), H₂O₂-generating System without liver microsome(■).

Table 2. Effect of various cofactors and modifiers on ethanol oxidation by rat liver microsomal preparation.*

Incubation medium	MEOS activity(nmoles Acetaldehyde production/min/mg protein)	effect(%)
1. NADPH-generating system	9.26	100
NaN ₃ (1mM)	7.42	80.1
Catalase(50μg/ml)	20.70	223.5
Catalase+NaN ₃	7.80	84.2
H ₂ O ₂ (0.1mM)	10.78	116.4
2. No NADPH-generating system	0	—
NADPH(0.17mM)	9.42	101.7
NAD ⁺ (0.33mM)	2.07	22.4
H ₂ O ₂ (0.1mM)	1.02	11.0
3. H ₂ O ₂ -generating system	8.31	89.7
without microsome	3.02	32.6

* Microsomes were preincubated with ethanol for 3 minutes at 37°C; the reaction was then started by addition of cofactors(NADPH-generating or H₂O₂-generating system) under the same conditions as in Fig. 1. When the effect of modifier was studied, the respective compounds were incubated in the preincubation medium.

Table 3. Microsomal ethanol oxidizing system(MEOS) activity.*

Reaction condition	MEOS activity(nmoles Acetaldehyde production/min/mg prot.)
NADPH-generating system	9.26±0.40
NADPH-generating system+NaN ₃ (1mM)	7.42±0.32
NADPH-generating system+Ascorbic acid(1mM)	11.34±0.26**
NADPH-generating system+NaN ₃ +Ascorbic acid	10.89±0.18**

* MEOS activity was determined by observing the production of acetaldehyde from 50 mM ethanol by rat liver microsomal preparation with NADPH-generating system(0.4 mM NADP⁺, 10 mM Glucose-6-phosphate, 7 units of Glucose-6-phosphate dehydrogenase) in the presence or absence of 1mM ascorbic acid.

** MEOS activity in the condition of existing simultaneously NADPH-generating system and ascorbic acid(1mM) in the reaction medium was corrected by subtraction of ethanol oxidation induced by the spontaneous autooxidation of ascorbic acid.

2) Ascorbic acid 가 Microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 미치는 영향

간 microsome 에 의해서 에탄올이 산화되어 아세트알데하이드를 생성하는 정도는 NADPH-generating system 을 사용한 경우 및 다른 반응조건에서 Fig. 1. 과 같이 15분까지 반응시간에 비례하여 직선적으로 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 1).

Microsome 을 통한 에탄올의 대사는 NADPH 와 O₂ 에 의한 전자전달체를 거치는 반응에 의해 일어난다고 알려진 바(Lieber and DeCarli, 1968) NAD⁺만 첨가한

경우 NADPH-generating system 을 사용하여 얻은 결과보다 에탄올 산화가 현저히 감소되는 것으로 보아 NAD⁺가 MEOS 의 조효소로 작용하지 못함을 알 수 있고, 이 결과는 MEOS 는 ADH 와 구별될 수 있는 다른 에탄올 대사효소를 알 수 있는 결과이다.

한편 H₂O₂(0.1 mM)만을 직접 반응액에 첨가한 경우 에탄올 대사에 효과가 없었으나, NADPH-generating system 과 같이 존재하는 경우 에탄올대사가 유의있는 증가를 보임과 동시에 catalase(50 μg/ml)첨가로 에탄올의 산화가 증가되는 결과는 NADPH 가 산화되며 H₂O₂를 생성하여 반응액내 H₂O₂가 존재하는 것을 의미

하는 것으로, 이러한 H₂O₂가 microsome에 의한 에탄올 대사에 직접 관여하기보다는 전구물질로 작용함을 예측할 수 있다(Table 2).

NADPH-generating system에 의한 에탄올의 산화 정도가 외부로부터 catalase의 첨가로 인해 현저하게 영향을 받고, microsome에 catalase 억제제인 sodium azide를 1 mM 첨가한 결과 에탄올 산화속도가 9.26 ± 0.40 nmoles acetaldehyde/min/mg protein에서 7.42 ± 0.32 nmoles acetaldehyde/min/mg protein으로 20%나 감소된 현상은 microsome 분리시 불순물로 존재하는 catalase에 의해 에탄올이 산화되는 정도가 azide에 의해 catalase가 억제되므로 감소한 결과였음을 볼 수 있었다.

NADPH-generating system내 ascorbic acid 1 mM을 첨가함으로써 에탄올 산화속도가 26.71 ± 1.08 nmoles acetaldehyde/min/mg protein으로 현저히 증가됨을 볼 수 있었다.

반응액내 microsome이 없이 단지 ascorbic acid 1 mM만 첨가한 경우에도 에탄올의 산화가 일어나는 것은 비효소적으로 ascorbic acid의 자동산화에 의해 생성된 ·OH radical에 의한 것으로 이와 같이 ascorbic acid에 의해 에탄올이 산화된 양만큼을 제거하여, 이

결과를 ascorbic acid 존재시 순수하게 microsome에 의해 에탄올이 산화된 것으로 정하여 표시한 결과 11.34 ± 0.26 nmoles acetaldehyde/min/mg. protein으로 22.5%(azide 1 mM이 포함된 경우에서는 45.4%)가 증가된 결과를 보였다(Table 3).

H₂O₂ 생성기전으로 0.4 mM xanthine과 0.02 units/ml xanthion oxidase를 사용하여 microsome에 불순물로 포함될 수 있는 catalase에 의한 에탄올의 산화를 측정된 결과 8.31 ± 0.26 nmoles acetaldehyde/min/mg protein으로 나타났다.

반응액내 xanthine + xanthine oxidase와 ascorbic acid 1 mM이 동시에 존재하는 경우 에탄올의 산화는 20.18 ± 1.81 nmoles acetaldehyde/min/mg protein이었고 여기서 ascorbic acid에 의한 에탄올의 산화를 제거한 결과 5.89 ± 0.33 nmoles acetaldehyde/min./mg. protein으로 ascorbic acid 첨가에 의해 H₂O₂-generating system을 이용한 microsome내 catalase의 에탄올 산화가 억제됨을 볼 수 있었다.

3) Ascorbic acid에 의한 비효소적인 에탄올산화

Ascorbic acid에 의한 에탄올의 산화는 ascorbic acid가 생리적인 pH 범위에서 산소에 의해 자발적으로 쉽

Table 4. Oxidation of ethanol by rat liver microsomal preparation with H₂O₂-generating system in the presence or absence of 1mM ascorbic acid.*

Reaction condition	Ethanol oxidation(nmoles Acetaldehyde production/min/mgprot.)
H ₂ O ₂ -generating system	8.31 ± 0.26
H ₂ O ₂ -generating system + Ascorbic acid(1mM)	5.89 ± 0.33**

Values are mean ± S.E. for 4~5 experiments.

* Oxidation of ethanol was determined by observing the production of acetaldehyde in the same condition as described in Table 3., except the reaction was started with H₂O₂-generating system(0.4 mM xanthine+0.02 units/ml of xanthine oxidase) in the place of NADPH-generating system.

** Ethanol oxidation was corrected by subtraction of the oxidation of ethanol induced by the spontaneous autooxidation of ascorbic acid.

Table 5. Effect of H₂O₂, hydroxy radical scavengerson the producti on of acetaldehyde by ascoric acid*

Addition	Acetaldehyde production (% change)
Complete system	100
Complete system + H ₂ O ₂ (0.1mM)	+22
Complete system + S.O.D.(20 µg/ml)	-15
Complete system + Sodium benzoate(50 mM)	-44
Complete system + Thiourea(50 mM)	-82

* The complete system was consisted of 0.1 mM phosphate buffer(pH 7.4) containing EDTA(0.1 mM) and ethanol(50mM).

게 산화되어(특히 금속이온이 존재하면) 반응성의 산소화물을 생성하며, 특히·OH radical 이 생성되면 에탄올이·OH radical scavenger 로 작용하여 아세트알데하이드로 산화된다고 알려져 있다(Cederbaum and Berl, 1982). 본 실험에서 반응액내 에탄올과 같이 ascorbic acid 를 반응시키면 16.89 ± 1.43 nmoles acetaldehyde/min/ml 반응액이었고, microsomes 을 반응액에 첨가한 경우에 있어서도 18.33 ± 2.28 nmoles acetaldehyde/min/ml 반응액으로 microsomes 의 유무에 관계없이 비효소적으로 에탄올의 산화가 일어남을 볼 수 있었다.

한편 ascorbic acid 에 의한 에탄올의 비효소적인 산화 정도는 thiourea(50 mM) 및 sodium benzoate (50 mM) 등 잘 알려진·OH radical scavenger 에 의해 쉽게 억제되었고, H_2O_2 0.1 mM 의 첨가에 의해 대조군에 비해 약 22%가 증가되나, superoxide dismutase (20 μ g/ml)에 의해 거의 억제를 받지 않는 것으로 보아, H_2O_2 가 ascorbic acid 에 의한 중간산물로 작용하며, O_2 radical 은 ascorbic acid 에 의한·OH radical 형성에 의미있게 관여되지 않을 것임을 볼 수 있었다 (Table 5).

고 찰

ADH 에 의한 알코올의 산화는 NAD^+ 가 NADH 로 환원되는 반응이 동반되는 것으로 이 조효소의 재산화가 ADH 활동도에 영향을 주게 되므로 20 mM 이상의 고농도 에탄올에서는 H_2O_2 와 catalase 를 통한 과산화성 반응 및 MEOS 에 의한 에탄올의 산화과정도 중요한 역할을 하리라 믿어지며(Liber and DeCarli, 1968) 이러한 에탄올의 대사경로들이 체내에서는 얼마만큼 관여할지에는 아직까지 정립된 바가 없으나, 일부 실험결과에서는 catalase 의 존재의 에탄올대사는 정상 간 세포에서 의미있는 역할을 하지 못하며(Teschke et al, 1976; Rognsad, 1974) MEOS 가 생체내 에탄올 대사의 변화에 주로 영향을 미친다고 보고되고 있다(Grunner et al, 1973; Lieber and DeCarli, 1968, 1972).

간 microsomes 에 의한 에탄올의 산화는 NADPH 와 O_2 를 필요로 하고 여러 면에서 MFO 에 의한 약물의 산화와 유사하다고 보고되고 있으나(Howkins and Kalant, 1972) 한편으로는 microsomes 분리시 불순물로 존재하는 catalase 에 의한 과산화반응에 의한 것이라는 주장도 있다(Carter and Isselbacher, 1971).

최근 MEOS 는 ADH 나 catalase 로부터 분리할 수 있고 재결합(reconstituted system)을 통한 실험에서도 에탄올의 산화가 증명되어 microsomes 에 의한 에탄올의 산화는 NADPH 의 존재의 전자전달계에 의해·OH radical 이 형성되고, 에탄올은·OH radical scavenger 로 작용한 결과라고 주장되고 있다(Cederbaum, et al, 1977; Ohnishi and Lieber, 1977, 1978).

Ascorbic 와 이 산화물은 생물체내의 산화-환원반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 아직까지 세포 내에서의 역할이 제대로 밝혀져 있지 않다.

Ascorbic acid 가 결핍된 guinea pig 에서 간 MFO 활성도의 감소와 Cytochrome P 450량의 감소를 볼 수 있으며(Zannoni et al, 1972), 다량의 ascorbic acid 투여로 혈중 ascorbic acid 농도의 증가와 일치되지는 않으나, MFO 활성도가 다시 원상으로 회복되거나 증가되며 NADPH-Cytochrome P 450 reductase 의 활성도가 ascorbic acid 의 존재로 증가된다는 보고 등은 ascorbic acid 가 아마도 Cytochrome P 450의 활성형의 assembly 에 중요한 작용을 하여 직접 또는 간접적으로 약물대사에 영향을 미치리라 주장되고 있다(Omaye and Turnbull, 1980; Peterson et al, 1983). 그 외에도 ascorbic acid 는 생리적인 pH 범위에서 산소에 의해 쉽게 자동산화되어 dehydroascorbate 로 되며 H_2O_2 와·OH radical 을 형성하게 되고 이들 radical 에 의해 생물학적 현상에 참여하는 등 복잡한 반응성을 나타내는데 이때 에탄올은·OH radical scavenger 로 작용하여 아세트알데하이드로 산화된다고 알려져 있다(Cederbaum and Berl, 1982).

그러므로 강력한 환원제로 체내에도 존재하며 MFO 에 영향을 미칠 수 있다고 보고된 ascorbic acid 를 이용하여 에탄올 대사에 관여하는 여러 효소에 대한 변화를 관찰한 결과에서 보면, ascorbic acid 1 mM 첨가에 의해 50 mM 이상의 에탄올에서는 ADH 활성도가 다소 감소되는 경향이나 5~100 mM 에탄올농도에서 의미있는 억제를 보이지 않은 결과는 in vitro 에서 환원제로 알려진 ascorbic acid 가 조효소인 NAD^+ 를 NADH 로 직접 환원시켜 ADH 활성도에 영향을 미치지 않음을 볼 수 있었다.

NADPH-generating system 을 사용하여 microsomes 에 의한 에탄올 산화 정도는 ascorbic acid 1 mM 첨가로 현저히 증가되었고, 이 결과는 Cohen(1974, 1977)의 보고처럼 비효소적인 에탄올의 산화가 반영된 결과이므로 이러한 비효소적인 산화를 제거한 경우 MEOS 에 의한 순수한 에탄올의 산화는 대조군 9.62 ± 0.40 에

서 11.34±0.26 nmoles acetaldehyde/min/mg protein 으로 22.5%가 증가하였으며, 이 현상은 ascorbic acid 가 비효소적인 산화이외에도 직접 MEOS 과 상호 작용으로 MEOS 의 활성도를 증가시키는 것을 의미한 결과였다.

NADPH-generating system 에서 생성되는 NADPH 의 역할은 microsome 의 전자전달계를 통해 자신이 산화되며 H₂O₂를 생성하는 외에도 Fe⁺⁺⁺를 Fe⁺⁺로 환원 시킨다는 관점에서 보면 ascorbic acid 에 의해 MEOS 활성도가 증가되는 기전은 microsomal Cytochrome P 450을 환원형으로 유지시키거나, 반응액내 금속이온의 Fe⁺⁺로 환원을 촉진시킨 결과일 수 있으며(Halliwel and Foyer, 1976), 한편으로는 ascorbic acid 가 NADPH 처럼 electron donor 로 작용하여 직접 전자전달계에 영향을 미쳐 에탄올대사에 필요한 전구물질 을 증가시켜 나타나는 결과라 해석될 수도 있다.

한편 microsome 분리시 같이 존재할 수 있는 catalase 에 의한 에탄올의 산화정도를 보기 위해 xanthine 과 xanthine oxidase 를 이용하였고 이때 생성된 H₂O₂ 에 의한 catalase 의 과산화성 에탄올 산화정도는 ascorbic acid 의 첨가로 억제되는 결과를 보였다.

그러나 이 반응조건에서는 xanthine 과 xanthine oxidase 에 의해 생성되는 O₂⁻와 H₂O₂에 의한 Iron-catalyzed Haber-Weiss 반응을 통해 microsome 없이도 에탄올의 산화가 일어나는 동시에, ascorbic acid 산화도 촉진되며(Nihikimi, 1975), 실험의 결과로 생성되는 아세트알데하이드가 직접 xanthine oxidase 의 기질로 작용하여 산화될 수 있는 복잡한 반응조건이므로 본 결과에서 보인 에탄올의 대사정도의 경량적인 비교는 정확한 비교가 될 수 없으므로, ascorbic acid 에 의해 catalase 의 과산화반응이 정말로 억제될 받는 지의 여부는 보다 세분된 실험이 수행되어야 할 것으로 보여졌다.

그러므로 반응액에 microsome 대신 직접 catalase (50 µg/ml)만을 첨가하고 xanthine+xanthine oxidase 를 사용한 실험에서 ascorbic acid 1 mM 을 가한 결과, catalase 의 활성도는 약 70%정도 억제를 보였으며, 이때 catalase 에 의한 과산화성 에탄올의 대사는 대조군에 비해 40%정도 억제되는 것으로 보아 ascorbic acid 가 catalase 에 억제효과를 나타냄으로써 catalase 에 의한 에탄올의 산화가 억제되리라 믿어졌다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 ascorbic acid 1mM 첨가로 인해 ADH 에 의한 에탄올의 산화는 영향을 받지 않았고, microsome 분획에 의한 에탄올의 산화가

증가된 현상은 직접 MEOS 활성도를 증가시킨 결과라고 보여졌다.

그러므로 ascorbic acid 에 의한 에탄올의 산화는 주로 비효소적인 자동산화에 의한 에탄올 산화이외에도 직접 microsome 의 전자전달계에 작용하거나, Cytochrome P 450의 활성형에 영향을 미쳐 에탄올의 산화를 증가시킬 수 있는 결과로서 생체에서 일어날 수 있는 반응성 산화물에 의한 반응효과이므로 간이의외 다른 조직에서도 에탄올대사에 ascorbic acid 가 관여될 수 있으리라 믿어지며, 조직 또는 혈액내 알코올 및 아세트알데하이드의 농도에 직접 영향을 미칠 수 있으리라 생각된다.

REFERENCES

- Bleich, H.L. and Boro, E.S.: *Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury*. N. Eng. J. Med. 298:888-893, 1978.
- Bonnichsen, R.K. and Brink, N.G.: *Liver alcohol dehydrogenase*. Methods. Enzymol. 1:495-502, 1955.
- Carter, E.A. and Isselbacher, K.J.: *The role of microsomes in the hepatic metabolism of ethanol*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 179:282-294, 1971.
- Cederbaum, A.I., Dicker, E., Rubin, E. and Cohen, G.: *The effect of dimethylsulfoxide and other hydroxyl radical scavengers on the oxidation of ethanol by rat liver microsomes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78:1254-126, 1977.
- Cederbaum, A.I. and Berl, L.: *Pyrazole and 4-methylpyrazole inhibit oxidation of ethanol and dimethyl sulfoxide by hydroxy radicals generated from Ascorbate, Xanthine oxidase and Rat liver microsome*. Arch. Biochem. Biophys. 216: 53-543, 1982.
- Cohen, G.: *A novel route for the metabolism of ethanol. The oxidation of ethanol by hydroxyl free radicals*. Alcohol and Aldehyde metabolizing systems. Vol 2. p403-412, Academic press, N.Y., 1974.
- Cohen, G.: *An acetaldehyde artifact in studies of the intraction of ethanol with biogenic amine systems: the oxidation of ethanol by ascorbic*

- acid. J. Neurochemistry. 29:761-762, 1977.*
- Conney, A.H.: *Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol. Rev. 19:317-366, 1967.*
- Greenberger, N.J., Cohen, R.B. and Isselbacher, K.J.: *The effect of chronic ethanol administration on the liver alcohol dehydrogenase activity in the rat. Lab. Invest. 14:264-271, 1965.*
- Grunnet, N., Quistroff, B. and Thieden, H.I.D.: *Rate limiting factors in ethanol oxidation by isolated rat liver parenchyma cells: Effect of concentration fructose, pyruvate and pyrazole. Eur. J. Biochem. 40:275-282, 1973.*
- Halliwell, B. and Foyer, C.H.: *Ascorbic acid, Metal ions and the superoxide radical. Biochem. J. 155:697-700, 1976.*
- Hawins, R.D. and Kalant, H.: *The metabolism of ethanol and its metabolic effects. Pharmacol. Rev. 24:67-157, 1972.*
- Hsu, J.M. and Hsieh, H.S.: *Ethanol increases urinary and tissue ascorbic acid concentrations in rats. Proc. Soc. Biol. Med. 170:448-452, 1972.*
- Krasner, N., Dow, J., Moore, M.R. and Goldberg A.: *Ascorbic acid saturation and ethanol metabolism. Lancet. 2:693-695, 1974.*
- Lieber, C.S. and DeCarli, L.M.: *Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding. Science. 160:917-918, 1968.*
- Lieber, C.S. and DeCarli, L.M.: *Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vivo characteristics and adaptive properties in vivo. J. Biol. Chem. 245:2505-2512, 1970.*
- Lieber, C.S. and DeCarli, L.M.: *The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. J. Pharmacol. Exp. Ther. 181:279-287, 1972.*
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. 193:265-275, 1971.*
- Nishikimi, M.: *Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the Xanthine-Xanthine oxidase system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63:463-468, 1975.*
- Ohnishi, K. and Lieber, C.S.: *Reconstitution of the microsomal ethanol oxidizing system. J. Biol. Chem. 252:7124-7131, 1977.*
- Ohnishi, K. and Lieber, C.S.: *Respective role of superoxide and hydroxyl radical in the activity of the reconstituted microsomal ethanol oxidizing system. Arch. Biochem. Biophys. 191:798-803, 1978.*
- Omaye, S.T. and Turnbull, J.D.: *Effect of ascorbic acid on haeme metabolism in hepatic microsomes. Life Science 27:441-449, 1980.*
- Peterson, F.J., Holloway, D.E., Duquette, P.H. and Jerry, M.: *Dietary ascorbic acid and hepatic mixed function oxidase activity in the guinea pig. Biochem. Pharmacol. 32:91-96, 1983.*
- Rognstad, R.: *Isotopic probes into pathways of ethanol metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 163:5044-551, 1974.*
- Sato, P.H. and Zannoni, V.G.: *Ascorbic acid and hepatic drug metabolism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 198:295-307, 1976.*
- Sutton, J.L., Basu, T.K. and Dickerson, J.W.: *Effect of pharmacological doses of ascorbic acid on the hepatic microsomal haemoproteins in the guinea pig. Br. J. Nutr. 46:27-33, 1983.*
- Teschke, R., Hasumura, Y. and Lieber, C.S.: *Hepatic ethanol metabolism: Respective roles of alcohol dehydrogenase, the microsomal ethanol oxidizing system, and catalase. Arch. Biochem. Biophys. 175:635-635-643, 1975.*
- Thurman, R.G., Ley, H.G. and Scholz, R.: *Hepatic microsomal ethanol oxidation, hydrogen peroxide formation and the role of catalase. Eur. J. Biochem. 25:420-430, 1972.*
- Winterbourn, C.C.: *Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. Biochem. J. 182:625-628, 1979.*
- Zannoni, V.G., Flynn, E.J. and Lynch, M.: *Ascorbic acid and drug metabolism. Biochem. Pharmacol. 21:1377-1392, 1972.*